

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio sobre el metabolismo lipídico hepático en la rata  
gestante**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Rosa María Arahuetes**

DIRECTOR:

**Arsenio Fraile Ovejero**

**Madrid, 2015**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

ARA  
est



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310034670

"ESTUDIO SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO HEPATICO EN LA  
RATA GESTANTE.

M E M O R I A

para  
optar al grado de Doctor  
en  
Ciencias Biológicas  
por

ROSA M<sup>a</sup> ARAHUETES PORTERO



Madrid, mayo 1.978

R. 27.265

El presente trabajo ha sido realizado en la Cátedra de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Com<sub>u</sub>plutense de Madrid, bajo la dirección del Profesor D. Arsenio Fraile Ovejero y el constante asesoramiento y ayuda del Profesor D. Angel Martín Municio, a quienes va dirigido mi agradecimiento por su extraordinario apoyo e interés.

Asímismo, deseo expresar mi gratitud al Dr. D. Antonio Suárez Sanz por su valiosa colaboración.

A Antonio Cámara, Araceli Gallego y Miguel Angel Mateu por su paciente y eficaz ayuda.

Por último, agradezco a todas las personas que me han ayudado, de alguna manera, con sus consejos, su cariño y aliento en momentos de cansancio, cuya enumeración sería larga y correría el riesgo de olvidar, inadvertidamente, algún nombre. Por ello, mi gratitud a todos por su colaboración.

## INDICE

	<u>Pág.</u>
<u>INTRODUCCION</u> .....	8
<u>1. METABOLISMO LIPIDICO</u> .....	9
1.1. FUNCION DEL HIGADO EN EL METABOLISMO LI- PIDICO .....	10
1.2.-BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS .....	12
1.2.1. <u>Síntesis citoplasmática</u> .....	12
1.2.2. <u>Síntesis mitocondrial</u> .....	16
1.2.3. <u>Síntesis microsomal</u> .....	16
1.2.4. <u>Síntesis de ácidos grasos insatura-</u> <u>dos</u> .....	18
1.3. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS .....	21
1.3.1. <u>Control de las enzimas de la biosín-</u> <u>tesis de ácidos grasos</u> .....	21
1.4. CATABOLISMO DE LOS ACIDOS GRASOS: $\beta$ -OXI- DACION .....	24
1.5. BIOSINTESIS DE TRIGLICERIDOS ,.....	27
1.6. BIOSINTESIS DE FOSFOLIPIDOS .....	30
1.7. METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEINAS .....	32
1.8. REGULACION DEL METABOLISMO LIPIDICO .....	37
1.8.1. <u>Regulación de la síntesis de trigli-</u> <u>céridos en hígado</u> .....	37
1.8.2. <u>Influencias hormonales sobre el me-</u> <u>tabolismo lipídico</u> .....	39
1.8.2.1. <u>Receptores hormonales y men-</u> <u>sajeros intracelulares</u> .....	39
1.8.2.2. <u>Movilización de los lípidos</u> <u>de depósito</u> .....	40
1.8.2.3. <u>Control hormonal de la este-</u> <u>rificación</u> .....	44
1.8.2.3.1.- Efecto de la in- sulina .....	45
1.8.2.3.1.1. Efecto sobre la síntesis hepáti- ca de ácidos grasos	47

1.8.2.3.1.2. Efecto sobre la síntesis de triglicéridos de hígado y plasma .....	49
1.8.2.4. <u>Control hormonal de la lipólisis</u> .....	50
1.8.2.4.1. Efecto de las catecolaminas .....	50
1.8.2.4.2. Efecto de la hormona de crecimiento .....	51
1.8.2.4.3. Efecto de la insulina .....	52
1.8.2.4.4. Efecto del glucagón .....	53
1.9. METABOLISMO LIPIDICO DURANTE LA GESTACION .....	56
1.9.1. <u>Influencias hormonales</u> .....	56
1.9.1.1. <u>Hormonas placentarias</u> .....	56
1.9.1.1.1. Hormonas esteroidicas .....	57
1.9.1.1.2. Lactógeno placentario .....	59
1.9.1.2. <u>Alteración del sistema endocrino durante la gestación</u> .....	63
1.9.1.3. <u>Regulación de los niveles plasmáticos de ácidos grasos: el ciclo glucosa-ácidosgrasos</u> .....	65
1.9.2. <u>Movilización de los lípidos durante la gestación</u> .....	69
1.9.3. <u>Biosíntesis de lípidos</u> .....	72
1.9.4. <u>Acidos grasos del plasma, del tejido adiposo y del hígado</u> .....	74
1.9.5. <u>Lipoproteínas plasmáticas</u> .....	78
1.9.6. <u>Algunos aspectos sobre las relaciones hormonales materno-fetales</u> .....	81
II. <u>MATERIAL Y METODOS</u> .....	87
2.1. MATERIAL .....	88
2.1.1. <u>Medios instrumentales</u> .....	88
2.1.2. <u>Productos</u> .....	88
2.2. Animales en experimentación .....	89
2.3. Determinación del día 0 de gestación .....	89
2.4. Perfusión hepática .....	90

2.4.1.	<u>Medio de perfusión</u>	90
2.4.2.	<u>Solución salina</u>	91
2.4.3.	<u>Albúmina</u>	91
2.4.4.	<u>Lavado de hemáties</u>	91
2.4.5.	<u>Técnica para la medida de hemoglobina.</u>	92
2.4.6.	<u>Preparación del medio de perfusión</u>	92
2.4.7.	<u>Aparato de perfusión</u>	93
2.4.8.	<u>Operación quirúrgica</u>	96
2.4.9.	<u>Planificación experimental</u>	98
2.5.	DETERMINACIONES ANALITICAS	100
2.5.1.	<u>Aislamiento de los lípidos totales</u>	100
2.5.2.	<u>Separación cromatográfica de los lí-</u> <u>pidos totales</u>	100
2.5.2.1.	<u>Preparación y aplicación de</u> <u>muestras</u>	100
2.5.2.2.	<u>Técnica de revelado</u>	102
2.5.2.2.1.	Colesterol y ésteres de colesterol	102
2.5.2.3.	<u>Medida de la radiactividad</u>	104
2.5.3.	<u>Análisis de ácidos grasos</u>	105
2.5.3.1.	<u>Cromatografía en fase de vapor</u>	105
2.5.3.1.1.	Preparación de las mues- tras	105
2.5.3.1.2.	Análisis de los ésteres metílicos	106
III.	<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	108
3.1.	<u>EXPERIENCIAS EN HIGADO PERFUNDIDO</u>	109
3.1.1.	PERFUSION DE HIGADO CON 10 $\mu$ Ci DE (1- <sup>14</sup> C) ACETATO	109
3.1.1.1.	<u>Ratas control</u>	109
3.1.1.2.	<u>Ratas gestantes</u>	115
3.1.2.	PERFUSION DE HIGADO CON 1mCi DE (1- <sup>14</sup> C) ACETATO	125

3.1.2.1. <u>Ratas control</u> .....	125
3.1.2.2. <u>Ratas gestantes</u> .....	137
3.1.2.3. <u>Análisis de ácidos grasos en</u> <u>lípidos totales de hígado</u> .....	151
3.2. <u>EXPERIENCIAS "IN VIVO"</u> .....	158
3.2.1. <u>Inyección intravenosa de <math>10\mu\text{Ci}</math></u> <u>de <math>(1-^{14}\text{C})</math> en ratas gestantes y</u> <u>control</u> .....	158
IV. CONCLUSIONES .....	170
V. BIBLIOGRAFIA .....	177

## I. INTRODUCCION.



## INTRODUCCION

Es un hecho clasicamente conocido que la gestación produce cambios notables en el metabolismo intermedio; si hasta hace relativamente poco tiempo las investigaciones de esta naturaleza se habían realizado sobre el metabolismo de hidratos de carbono, actualmente se considera - que muchas de las alteraciones tienen lugar a nivel de otros esquemas metabólicos, y concretamente el metabolismo lipídico, que se ha transformado así en un objetivo de primera importancia.

En la revisión bibliográfica del tema objeto de esta memoria dedicaremos atención en primer lugar al metabolismo lipídico en el organismo normal para pasar en una segunda parte al estudio de la literatura existente sobre el metabolismo lipídico durante la gestación.

## I.- METABOLISMO LIPIDICO

La grasa almacenada en el organismo constituye una importante reserva de energía en los seres vivos. La cantidad de grasa que está presente en cada momento es el resultado de su deposición y de su movilización.

La grasa depositada en el tejido adiposo y en otros órganos, tal como el hígado, puede proceder de la dieta o de síntesis de "novo". Ambos procesos, movilización y síntesis, se regulan automáticamente, si bien pueden estar influidos por hormonas y de este modo se mantiene el balance entre lipogénesis y lipólisis.

La lipogénesis ocurre principalmente en el hígado en la mayor parte de los vertebrados; sin embargo también ocurre de un modo considerable en el tejido adiposo.

Los triglicéridos que se encuentran en el hígado son liberados a la sangre, en donde son transportados como lipoproteínas. Las lipoproteínas, por acción de la lipoproteína lipasa del tejido adiposo, liberan triglicéridos, que son almacenados por los adipocitos.

El tejido adiposo es el primer lugar de almacenamiento de grasa en los vertebrados superiores, pero también existe un almacenamiento considerable en el hígado, especialmente en algunas especies de vertebrados inferiores (DESSAUER, 1955; JONAS y BILINSKI, 1964).

La movilización consiste en la liberación de ácidos grasos libres a la sangre, en donde se combinan con la albúmina. Los ácidos grasos libres son tomados por el músculo y el hígado y degradados por la vía de la  $\beta$ -oxidación a acetil-CoA, la cual puede entrar al ciclo del ácido cítrico y producir ATP.

### 1.1. FUNCION DEL HIGADO EN EL METABOLISMO LIPIDICO.

Aunque el metabolismo de las grasas puede ocurrir en casi todas las células del organismo, algunos aspectos del mismo se producen mucho más rápidamente en el hígado - que en las demás células, hasta el punto que probablemente el 50%, o más, de las diferentes interconversiones grasas ocurren en el hígado (Fig. 1) y no en otra parte. Algunas de las funciones específicas del hígado en el metabolismo lipídico son las siguientes:

- $\beta$ -Oxidación de ácidos grasos y formación de ácido acetoacético.
- Formación de lipoproteínas
- Formación de cantidades considerables de colesterol y fosfolípidos.
- Conversión de grandes cantidades de hidratos de carbono y proteínas en grasas.

Para obtener energía de las grasas neutras, éstas primero se separan en sus componentes glicerol y ácidos grasos, luego los ácidos grasos son rotos por la  $\beta$ -oxidación a acetyl-CoA. Esta, a su vez, puede penetrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y oxidarse para liberar cantidades considerables de energía. Esta  $\beta$ -oxidación probablemente pueda ocurrir en todas las células, pero se produce tan rápidamente en las células hepáticas, en comparación con otras, que el 60% aproximadamente de toda la oxidación inicial de los ácidos grasos en el cuerpo tiene lugar en el hígado. Sin embargo, el hígado no puede aprovechar toda la acetyl-CoA formada; la restante es condensada por la unión de dos moléculas dando ácido acetoacético que es un ácido muy soluble que pasa desde el interior de las células hepáticas al medio extracelular, y luego es transportado para ser absorbido por los demás tejidos. Es

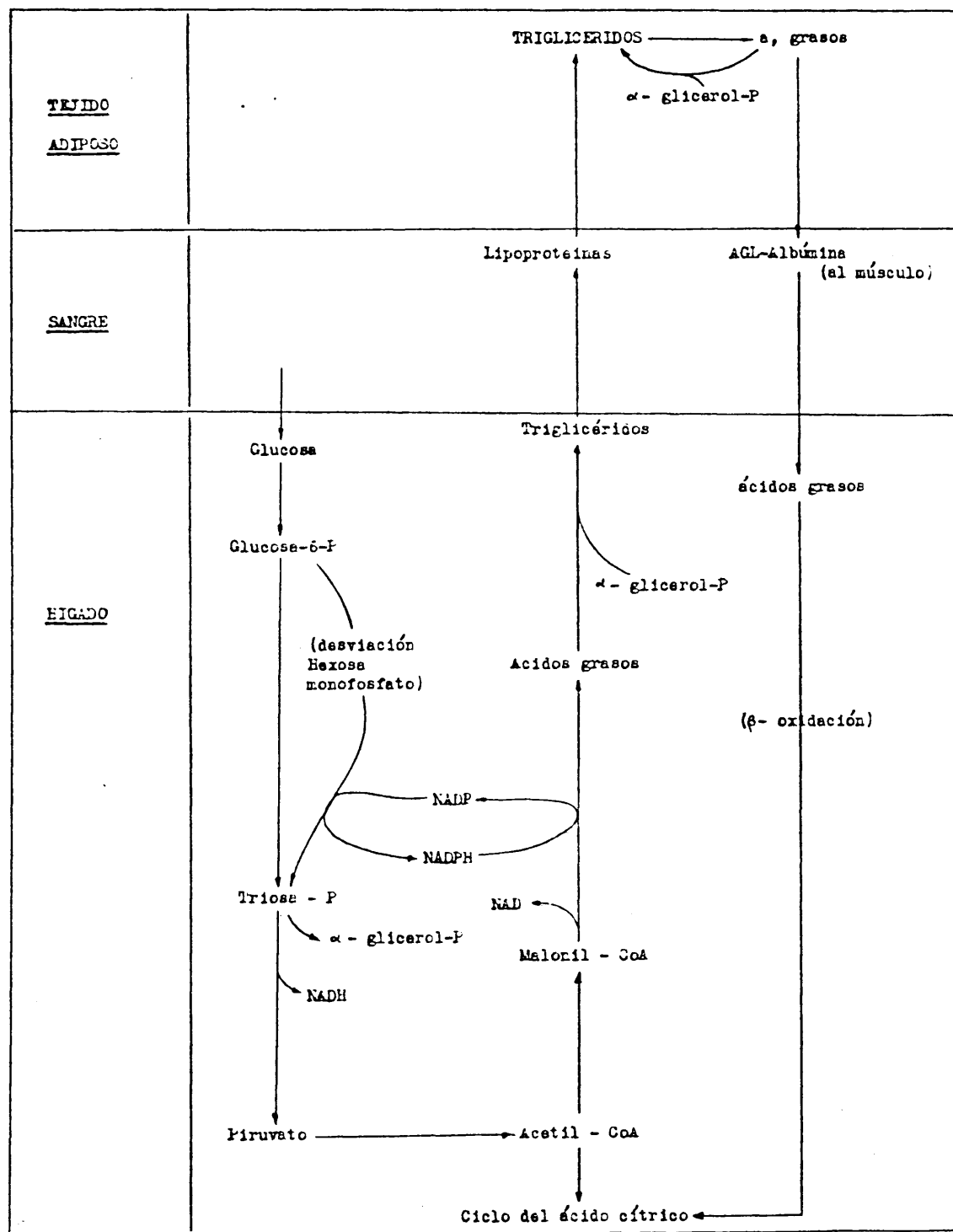


Figura 1. Esquema simplificado del metabolismo lipídico hepático.

tos tejidos, a su vez, vuelven a convertir el ácido acetoacético en acetil CoA, y luego lo oxidan en la forma acostumbrada. Por lo tanto, en esta forma, el hígado es responsable de la mayor parte del metabolismo de las grasas.

Excepto por lo que se refiere al empleo del colesterol para formar sales biliares, no conocemos bien las funciones del colesterol y de los fosfolípidos formados en el hígado. Aproximadamente el 80% del colesterol es convertido en sales biliares; el resto penetra en la sangre y es transportado principalmente bajo la forma de lipoproteínas. Es posible que ambas sustancias, junto con las proteínas y las fracciones de triglicéridos de las lipoproteínas, sean absorbidas por las células de todo el organismo para ayudar a formar las membranas celulares y las estructuras intracelulares. Es bien sabido que la mayor parte de las estructuras membranosas están formadas por proteínas, colesterol, fosfolípidos y triglicéridos.

En el hígado también tiene lugar síntesis lipídica a partir de hidratos de carbono y proteínas.

## 1.2.- BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS.

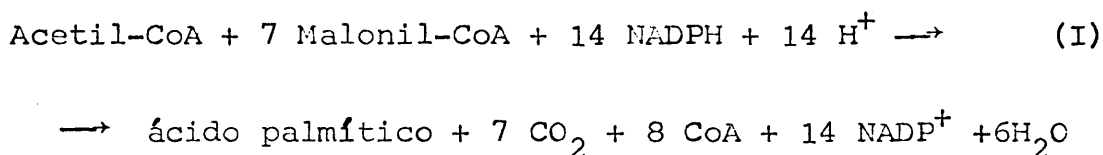
### 1.2.1.- Síntesis citoplasmática.

Las rutas de biosíntesis de ácidos grasos y su control han sido ampliamente estudiadas en vertebrados y en microorganismos, recopilándose estos conocimientos en numerosas publicaciones (WAKIL, 1961, 1963; LYNN, 1967; VAGELIS, 1971; VOLPE y col. 1973).

La ruta utilizada para la formación de ácidos grasos a partir de acetil-CoA, tiene lugar en el citoplasma celular por medio de dos complejos enzimáticos que

actúan de un modo secuencial, acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa.

La ecuación (I) expresa la estequiometría total de la síntesis del ácido palmítico, principal ácido graso producido en la mayor parte de los sistemas biosintéticos.



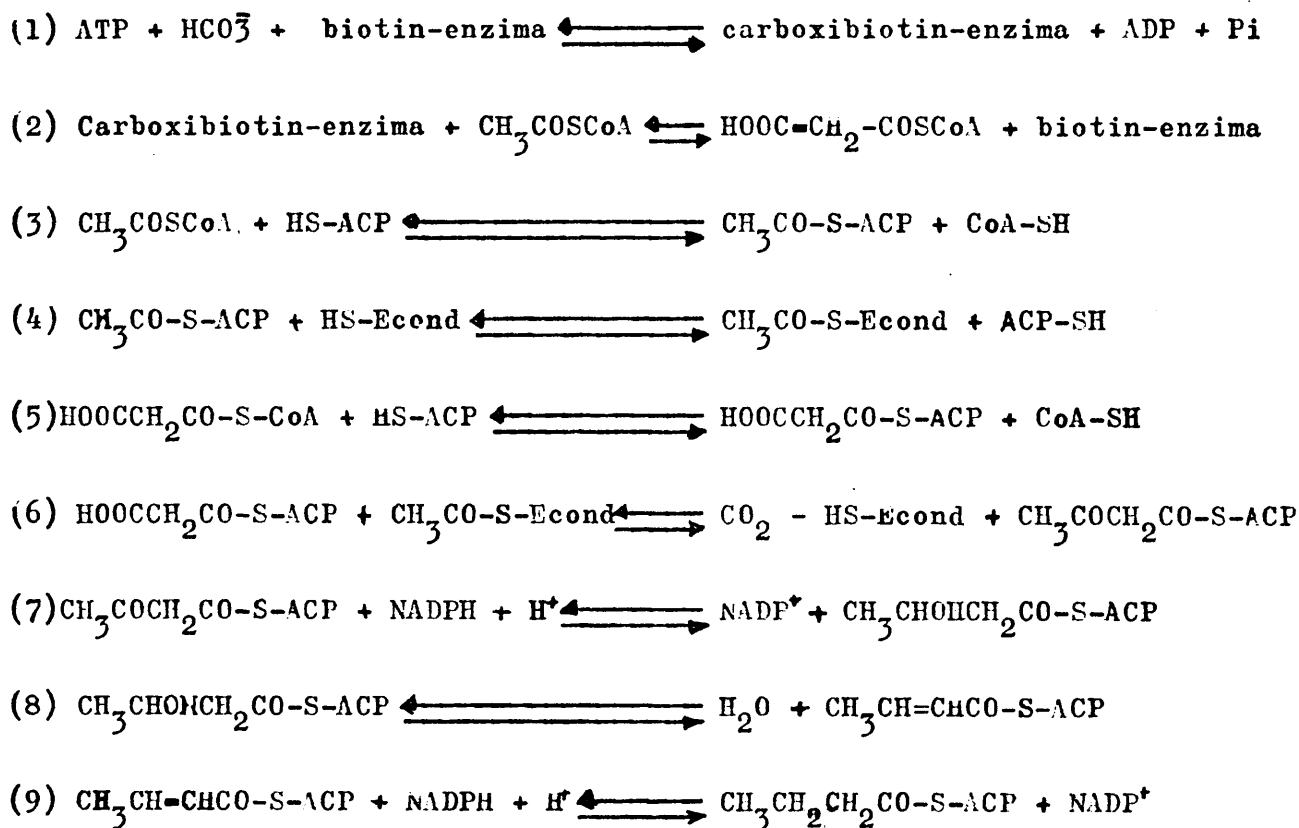
La acetil-CoA carboxilasa cataliza la primera etapa de la síntesis de ácidos grasos a partir de acetil-CoA; es una reacción de carboxilación dependiente de biotina, en la que se forma malonil-CoA a partir de acetil-CoA y transcurre en dos pasos (VAGELOS 1964. Fig. 2; reacciones 1 y 2).

La acetil-CoA carboxilasa ha sido aislada y purificada en una gran variedad de tejidos animales, plantas, levaduras y otros microorganismos. En las células animales la enzima se localiza en el citoplasma, aunque se ha sugerido su asociación a microsomas en el hígado de paloma (MARGOLIS y VAUGHAN, 1962).

La secuencia de reacciones que conducen a la síntesis completa de los ácidos grasos a partir de malonil-CoA es catalizada por el sistema enzimático denominado ácido graso sintetasa, descubierto inicialmente por Lynen (1961) en levaduras bajo la forma de un complejo multienzimático.

LYNEN propuso que los intermediarios de la síntesis de los ácidos grasos están unidos por enlaces tioéster a las enzimas constituyentes del complejo, hipótesis corroborada por VAGELLOS y col. al aislar del sistema enzimático de *E. coli* una proteína termoestable, de bajo peso molecular, a la que denominaron "proteína portadora de acilo" (ACP), que es el exponente central del complejo, y a ella se unen los grupos acilo de los intermediarios a través del resto 4-fosfoproteína de ACP, formando enlaces tioéster. Así pudo establecer la secuencia de reacciones intermedias de la biosíntesis de ácidos grasos en este microorganismo (WAKIL, 1964; VAGELLOS, 1966, Fig. 1; reacciones 3-9).

En la reacción (3) de la Fig. 2, la enzima acetil-CoA-ACP transacilasa cataliza la transferencia de un resto acetilo desde el grupo SH de la coenzima A al del ACP, para ser transferido luego (reacción 4) al SH de la enzima condensante. El resto malonilo es transferido por la malonil CoA-ACP transacilasa al ACP (reacción 5), teniendo lugar a continuación la reacción de condensación (6); el  $\beta$ -acetoacil derivado formado experimenta sucesivamente una reducción con NADPH (7), una deshidratación (8) y una segunda reducción con NADPH (9), formándose el correspondiente tioéster saturado acil-ACP, el cual puede reaccionar con la enzima condensante para formar el intermediario acil-enzima, liberando el ACP que reacciona con otro resto malonil, iniciando una nueva secuencia de reacciones, en la cual el ácido se alarga de nuevo con dos átomos de carbono; y así sucesivamente hasta alcanzar una longitud determinada, para lo cual se produce la separación de la ácido graso-sintetasa.



53/0030620

Figura 2.- Esquema para la síntesis citoplásmica de ácidos grasos. Las reacciones (1) y (2) son catalizadas por la acetil-CoA carboxilasa y las reacciones - (3) - (9) son catalizadas por el complejo ácido graso-sintetasa.



### 1.2.2.- Síntesis mitocondrial.

Es un mecanismo de elongación mediante el cual se realiza el alargamiento de los ácidos grasos preformados por adición sucesiva de las unidades de acetil-CoA.

El mecanismo mitocondrial es en esencia el inverso del mecanismo de oxidación, excepto que se requiere NAD para el paso final, en lugar de FAD (LANGDON, 1957). Este sistema produce esencialmente ácidos grasos de  $C_{18}$ ,  $C_{20}$ ,  $C_{22}$ , y  $C_{24}$ .

La supuesta secuencia del alargamiento en cuatro etapas se muestra en la Fig. 3 y este esquema presupone que la presencia de ambos tipos de nucleótidos es necesaria para obtener el máximo de síntesis (WAKIL, 1963). Además, la síntesis de ácidos grasos por elongación requiere fosfato de piridoxal.

### 1.2.3.- Síntesis microsomal.

Este mecanismo consiste en una elongación de cadenas de ácidos grasos en presencia de malonil-CoA y NADPH (STOFFEL y ACH, 1964; MOHRHAUER y col. 1967). La acetil-CoA no puede suministrar los dos carbonos para la elongación de este sistema. El NADH puede servir de donador de electrones, pero el NADPH es un sustrato más efectivo.

La elongación microsomal difiere de la biosíntesis citoplasmática en cuanto que:

- Los compuestos intermedios en el mecanismo de síntesis citoplasmática permanecen ligados a proteínas y no son derivados de CoA, mientras que en la síntesis microsomal, estos compuestos intermedios se liberan

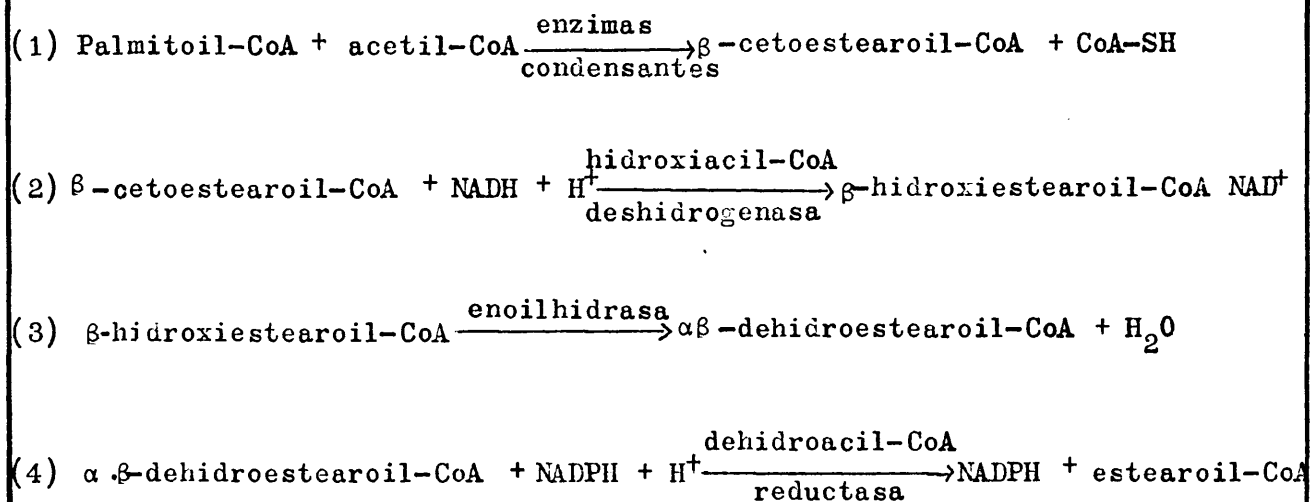


Figura 3.- Esquema de la síntesis mitocondrial de ácidos grasos.

como derivados de CoA.

- Las cadenas más elongables en la síntesis microsomal, son de 10 a 16 átomos de carbono.

- La actividad del sistema de elongación microsomal, crece al aumentar el número de dobles enlaces en el sustrato.

Este último punto parece indicar que el sistema de elongación microsomal está relacionado con la biosíntesis de largas cadenas de ácidos poliinsaturados.

#### 1.2.4.- Síntesis de ácidos grasos insaturados.

Se han descrito solamente dos mecanismos distintos para la introducción de dobles enlaces "cis" en las moléculas de ácidos grasos saturados.

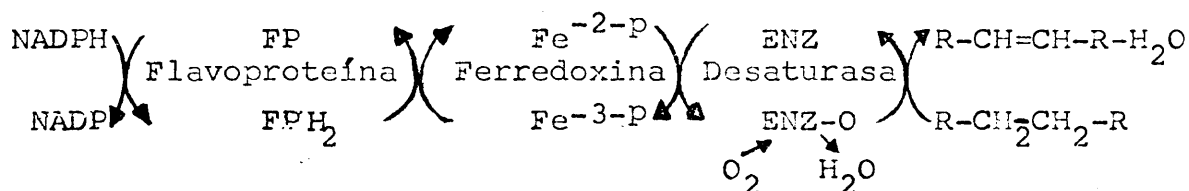
En algunas bacterias se introduce en cadenas de ácidos grasos saturados de mediana longitud (generalmente de 10 átomos de carbono), un doble enlace "cis", en posición 3 por deshidratación de un intermediario en la síntesis "de novo" de ácidos grasos, el  $\beta$ -hidroxiacil tioéster derivado del acil-ACP. La enzima que actúa en esta reacción es la  $\beta$ -hidroxidecanoil tioéster deshidratasa (KASS y col., 1967; BROCK y col., 1967; RANDO y col., 1968; HELMKAMP y col., 1968; ENDO y col. 1970). La elongación de la cadena del 3-cis derivado da lugar a largas cadenas de ácidos grasos insaturados (K. BLOCH, 1969). Esta ruta anaerobia es idéntica (excepto por la formación del 3-4 doble enlace) a la que conduce a la biosíntesis de ácidos grasos saturados en el citoplasma celular.

Un segundo mecanismo para la formación de dobles enlaces "cis" es la desaturación, por oxígeno molecular, de largas cadenas de ácidos grasos (BLOOMFIERLD y col. 1960) JAMES, 1968; HITCHCOCK y NICHOLS, 1971).

El mecanismo para la desaturación de ácidos grasos dependiente de oxígeno no está definido, sobre todo por la inestabilidad del sistema.

NAGAI y BLOCH (1966, 1968) han estudiado el transporte de electrones en la desaturación del estearil-ACP por un sistema soluble dependiente del  $O_2$  molecular en *E. gracilis*; esta desaturación no es afectada por altas concentraciones de CO (inhibidor del citocromo P-450).

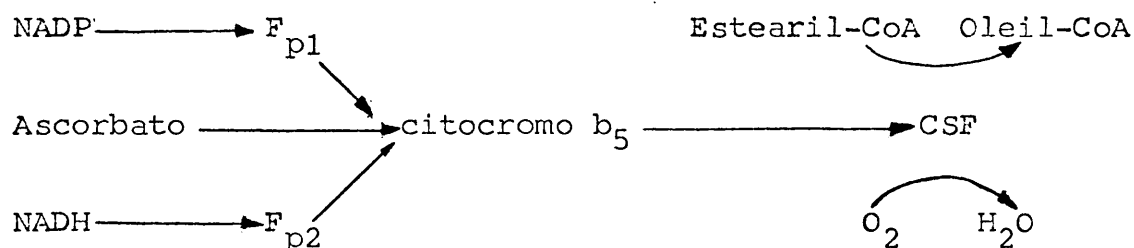
Basándose en estos resultados, BLOCH (1969) propone el siguiente transporte de electrones:



OSHINO y cols. (1966, 1971a, 1971b, 1972a, 1972b) han estudiado el sistema microsomal responsable de la desaturación del ácido esteárico a oleico en tejidos de rata. Este sistema está compuesto de al menos cuatro proteínas; NADH-citocromo  $b_5$  reductasa ( $F_{p2}$ ), NADPH-citocromo-reductasa ( $F_{p1}$ ), citocromo  $b_5$  y un componente terminal llamado factor sensible al cianuro (CSF) que parece tener una misión activadora del oxígeno.

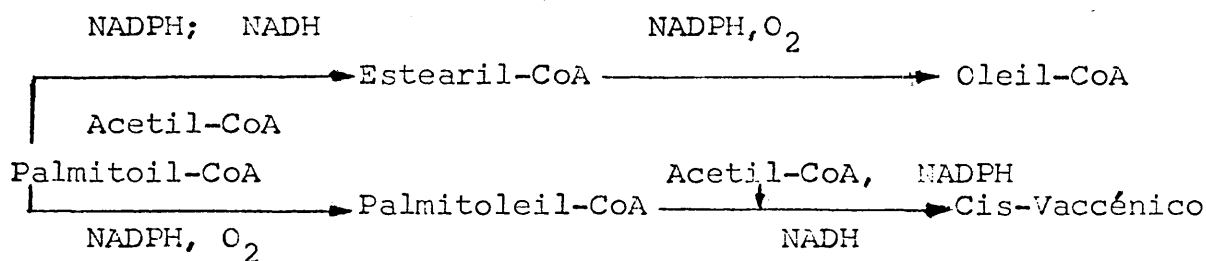
Otros autores están de acuerdo con este esquema propuesto por OSHINO y col., habiendo aportado nuevos co

nocimientos sobre su funcionamiento HOLLOWAY y WAKIL, (1970); GAYLO y col. (1970); y PRENNER, (1971). En el siguiente esquema se resume el proceso:



Los microsomas tienen también capacidad para desaturar ácidos monoenoicos y dienoicos (HOLLOWAY y col. 1963), pero no está aún determinado si el sistema enzimático responsable de esta conversión es el mismo que desatura ácidos grasos saturados.

MEAD (1961) ha comprobado que los microsomas de mamíferos tienen capacidad para sintetizar ácidos grasos poliinsaturados por elongación y desaturación de otros ácidos grasos precursores con lo que el mismo ácido graso saturado puede servir como precursor de ácidos insaturados de diferente longitud de cadena.



Todos los ácidos polienoicos presentes en los mamíferos se forman por reacciones de elongación y/o desaturación a partir de cuatro precursores: palmitoleico, oleico, linoleico y linolénico. Sin embargo, los ácidos

linoleico y linolénico no pueden ser sintetizados por los mamíferos, quienes tienen que ingerirlos de fuentes vegetales, por lo que son ácidos grasos esenciales.

### 1.3.- REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS

#### 1.3.1.- Control de las enzimas de la biosíntesis de ácidos grasos.

Se considera generalmente que la actuación de la acetil-CoA carboxilasa es la etapa limitante de la biosíntesis de ácidos grasos "in vitro", aún cuando si la enzima se ensaya en condiciones óptimas de activación su velocidad es similar a la de la ácido graso sintetasa - (MAJERUS y col. 1968). La acetil CoA carboxilasa está regulada tanto en su actividad como en sus niveles; la actividad enzimática resulta regulada alostéricamente por diversos efectores, de los cuales los ácidos tricarboxílicos y los acil-CoA de cadena larga se pueden considerar como efectores potencialmente importantes desde el punto de vista fisiológico.

La acción activadora ejercida por el citrato fué puesta de manifiesto por numerosos autores (MARTIN y VAGELLOS, 1962; LYNN y LANE, 1970). Los análisis cinéticos han demostrado que el efecto más importante de la activación por citrato es sobre la velocidad máxima y no sobre la Km.

BORTZ y LYNN (1963) han demostrado que concentraciones fisiológicas de acil-CoA de cadena larga inhiben la actividad de la acetil-CoA-carboxilasa; esta inhibición es competitiva con respecto al citrato y no competitiva con relación a los sustratos de la reacción, estan

do además asociada a la despolimerización de la misma. Estudios recientes realizados por LUNZER y col. (1977) corroboran y aportan nuevos datos acerca de dicha inhibición.

La actividad de la acetil-CoA carboxilasa en el hígado está muy disminuida en ratas en ayunas, en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa y en ratas a las que se ha provocado diabetes aloxánica. Los estudios inmunológicos han demostrado que estos efectos son debidos a una disminución de la cantidad de la enzima. Por otra parte, se ha comprobado que estas alteraciones se deben a modificaciones tanto en la síntesis como en la degradación de la enzima. Así, en estados diabéticos, la velocidad de degradación es normal, mientras que la velocidad de síntesis está disminuida (NAKANISHI y NUMA, 1970); en los animales sometidos a ayuno, la disminución de la cantidad de enzima se debe a ambos efectos, disminución de la síntesis y aumento de la degradación (NAKANISHI y NUMA, 1970; MAJERUS y KILBURN, 1969).

En el complejo multienzimático ácido graso sintetasa, los estudios "in vitro" del fenómeno de disociación-reasociación indican la posible influencia que sobre la actividad enzimática "in vivo" pueden ejercer los cambios físicos y químicos en el ambiente celular. Pero, además, la regulación de este complejo multienzimático está influenciada por modificadores alostéricos, por condiciones nutritivas, hormonales y de desarrollo, así como por represión en su síntesis, en diversos microorganismos.

La ácido graso sintetasa de diversos orígenes - está modulada en su actividad por la palmitoil-CoA y otros derivados acil-CoA de cadena larga (ROBINSON y col. 1963;

LUST y LINEN, 1968). En cuanto al mecanismo de actuación de estos tioésteres, se han dado diversas interpretaciones: LUST y LYNN (1968) proponen que se trata de un mecanismo de retroinhibición, mientras que DORSEY y PORTER (1968) lo atribuyen a una acción detergente que sería inespecífica.

La ácido graso sintetasa responde en sus niveles a las diversas influencias nutritivas y hormonales. Así, la administración a ratas en ayunas, de dietas exentas de grasa provoca una marcada elevación de los niveles de ácido graso sintetasa hepática (ALLMAN y col. 1965). Por el contrario, los ácidos linoleico, linolénico y araquidónico, incluso en muy pequeñas proporciones, hacen descender los niveles de ácido graso sintetasa (CHU y col., 1969); este efecto es dependiente de la composición en ácidos grasos de la dieta y del órgano estudiado; así, el efecto depresivo originado por el ácido linoleico es más acusado en tejido adiposo que en hepático (EGWIN y SGCUTAS, 1972). Por otra parte, en el hígado de las ratas en ayunas o aloxanizadas la concentración de ácido graso sintetasa está disminuida, y recupera los niveles normales en los animales diabéticos por tratamiento con insulina, efecto que se atribuye a la síntesis adaptativa de la enzima (BURTON y col. 1969).

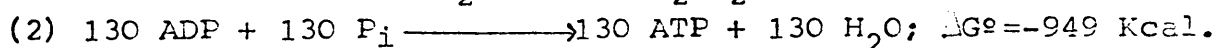
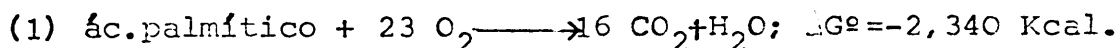
También se ha estudiado la actividad ácido graso sintetasa en hígado y cerebro en relación con el desarrollo animal (VOLPE y KISHIMOTO, 1972). La actividad en el cerebro es considerablemente mayor en los períodos fetal y lactante que en el adulto; la actividad en el hígado es baja, excepto una elevación transitoria en el período perinatal, hasta la terminación de la lactancia, en que ocurre una rápida y notable elevación.



#### 1.4.- CATABOLISMO DE LOS ACIDOS GRASOS: $\beta$ -OXIDACION.

Los animales disponen, por una parte, de mecanismos para la digestión, transporte y síntesis de lípidos neutros y, por otra, son capaces de degradarlos hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  con liberación de energía (DOLE, 1965). Las grasas neutras liberan 9 Kcal./g. cuando la combustión es completa, mientras que los hidratos de carbono y las proteínas sólo producen 4 Kcal./g.

La oxidación del ácido palmítico es realizada por la operación secuencial de la  $\beta$ -oxidación y el ciclo de Krebs. De las 2,340 Kcal/mol de energía libre desprendidas en este proceso, aproximadamente el 40% es utilizado para sintetizar 130 moles de ATP (Lehninger, 1975).



El catabolismo de los ácidos grasos de cadena larga  $\text{C}^n$  (Fig. nº 4) comienza con su activación en forma de acil-CoA; la enzima encargada de ello es la acil-CoA sintetasa, encontrada por primer vez por KNORBERG y PRICER (1953) en microsomas de hígado de rata. Dicha enzima tiene una doble localización (VAN TOL y HULSMANN, 1969), correspondiendo un 70% de la actividad total a los microsomas y el resto a las mitocondrias. Por otro lado, la enzima está firmemente ligada a las membranas de ambos orgánulos subcelulares. Teniendo en cuenta que las enzimas del ciclo de la  $\beta$ -oxidación residen en el interior de la mitocondria y que la membrana mitocondrial es impermeable a los acil-CoA derivados (KORUK y col., 1966), deberá tener

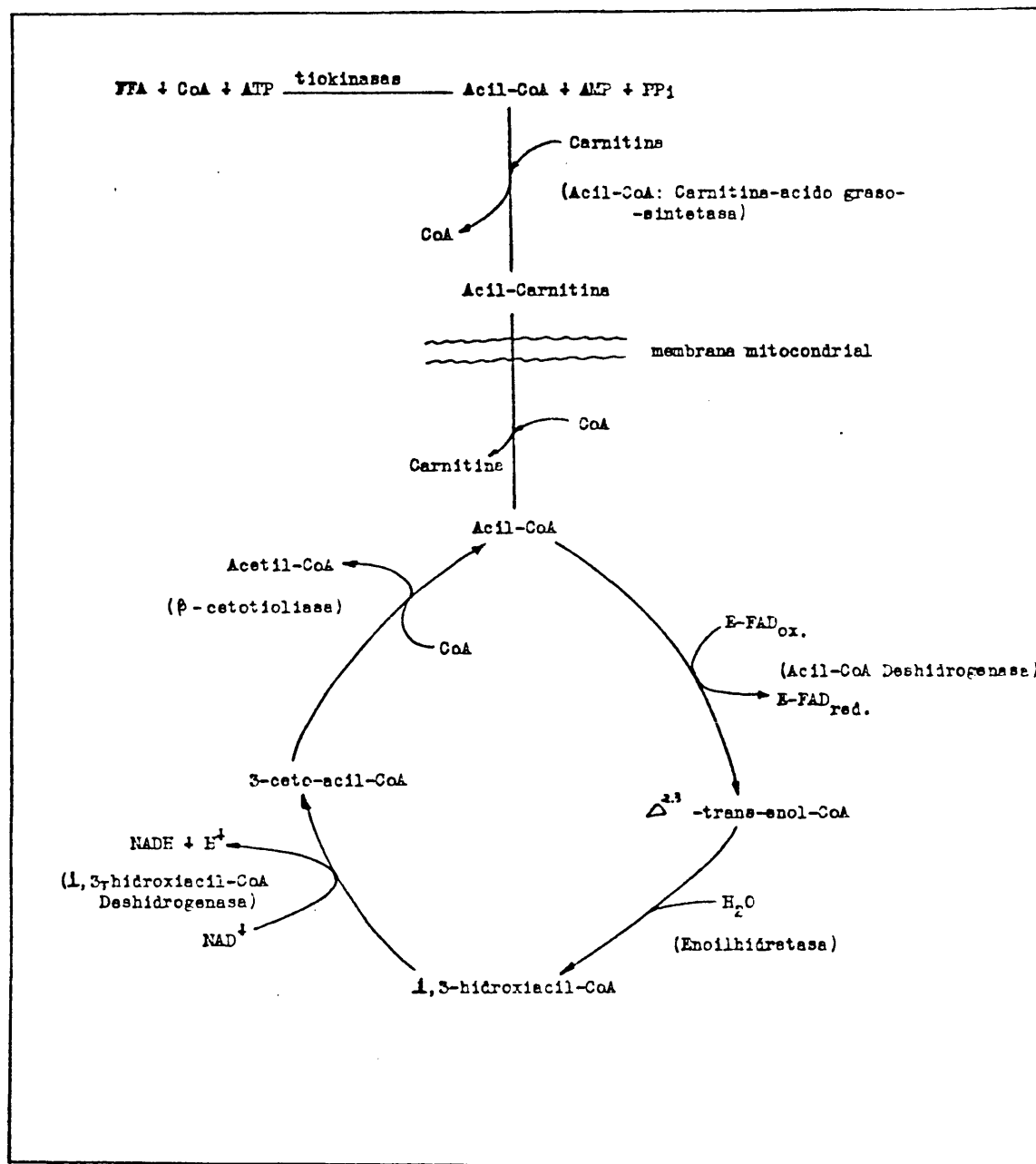


Figura 4. Esquema de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos.

lugar la formación de un nuevo derivado que pueda atravesar esta barrera. De este modo, el transporte dentro de la mitocondria es efectuado por transferencia de restos acilo a carnitina, dichos derivados pueden pasar la membrana mitocondrial hasta alcanzar el compartimiento de la  $\beta$ -oxidación.

Es importante resaltar que una vez formada la acil-CoA, el ácido graso puede seguir dos caminos:

- síntesis de triglicéridos,
- síntesis de acil-carnitina y posterior  $\beta$ -oxidación mitocondrial.

Todos los autores coinciden en que esta competencia entre la acilación del glicerol y de la carnitina constituyen un punto importante de control y de ácidos grasos en el hígado y, por consiguiente, de la cetogénesis.

Una vez la acil-CoA dentro de la mitocondria, comienzan las etapas secuenciales de la  $\beta$ -oxidación que la degradan a acetil-CoA. El destino de esta acetil-CoA formada, se puede resumir en tres puntos:

- transporte al citoplasma para la síntesis de lípidos,
- oxidación en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos,
- cetogénesis.

LOWEINSTEIN (1969-75), ha estudiado la valoración, purificación y caracterización de las enzimas del ciclo de la  $\beta$ -oxidación. Con respecto a la regulación de dicho ciclo, se acepta de una manera general que está controlado por la cadena respiratoria y por la fosforilación oxidativa (WILLIAMSON y HEMS, 1970).

Existe una interrelación completa entre el catabolismo de los ácidos grasos y el de los carbohidratos. Al ltos niveles del primer proceso inhiben este último y promueven la gluconeogénesis y la cetogénesis en el hígado de mamíferos (BRESSLER, 1970). Por el contrario, cuando se incrementa el catabolismo de los hidratos de carbono, disminuye el catabolismo de los ácidos grasos, principalmente, reduciendo la movilización de ácidos grasos libres desde los depósitos de grasas.

La  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos parece ser un notable proceso en el contexto de la fisiología comparada. Todos los metazoos, con la posible excepción de los parásitos anaerobios (obligados), parecen tener las enzimas de la  $\beta$ -oxidación.

#### 1.5.- BIOSÍNTESIS DE TRIGLICÉRIDOS

Los triglicéridos, que actúan como lípidos de depósito, son activamente sintetizados por las células hepáticas y adiposas de los mamíferos.

La biosíntesis "de novo" de triglicéridos y fosfolípidos (KENNEDY, 1961) tiene lugar mediante una ruta que es en parte común, en la cual el ácido fosfatídico ocupa una posición central (Fig. nº 5).

Para la síntesis de triglicéridos se requieren dos precursores principales:  $\alpha$ -glicerofosfato y acil-CoA. El  $\alpha$ -glicerofosfato procede de dos fuentes: una a través de la fosforilación del glicerol mediante ATP, y otra por reducción de la dihidroxiacetona-P; ambas reacciones tienen lugar en el citoplasma celular y constituyen una vinculación directa con la vía degradativa glicolítica.

Los estudios llevados a cabo sobre localización subcelular y especificidad del sustrato en la acilación del  $\alpha$ -glicerofosfato ponen de manifiesto que, en hígado de rata, las enzimas acilantes están localizadas en la membrana mitocondrial externa y en el retículo endoplásmico.

En mitocondrias de distintos órganos de rata y en los de hígado de diferentes especies de mamíferos (rata, conejo, bovino, mono, humanos) los sustratos más efectivos en la acilación del  $\alpha$ -glicerofosfato son los ácidos grasos saturados, existiendo dos actividades máximas en hígado de rata que dependen de la longitud de la cadena, una para el palmítico y otra para el laúrico (DAAE, 1972, a, 1972 b, 1973). El principal producto de la reacción mitocondrial es el ácido lisofosfatídico.

En microsomas, los ácidos grasos saturados e insaturados son buenos sustratos para las reacciones de acilación, y el producto principal en la reacción microsomal es el ácido fosfatídico (DAAE, 1972 a, 1973).

Para formar los triglicéridos, los ácidos fosfatídicos experimentan hidrólisis por una fosfatasa específica y forman los diglicéridos. Estos últimos reaccionan entonces con una tercera molécula de acil-CoA graso para rendir triglicéridos.

En las células de la mucosa intestinal de los animales superiores, que se muestran muy activas sintetizando triglicéridos durante la absorción de ácidos grasos del intestino, se pone en juego otro tipo de reacción de acilación. Los monoacilglicéridos formados durante la digestió*n* intestinal pueden ser acilados directamente, sin ne-

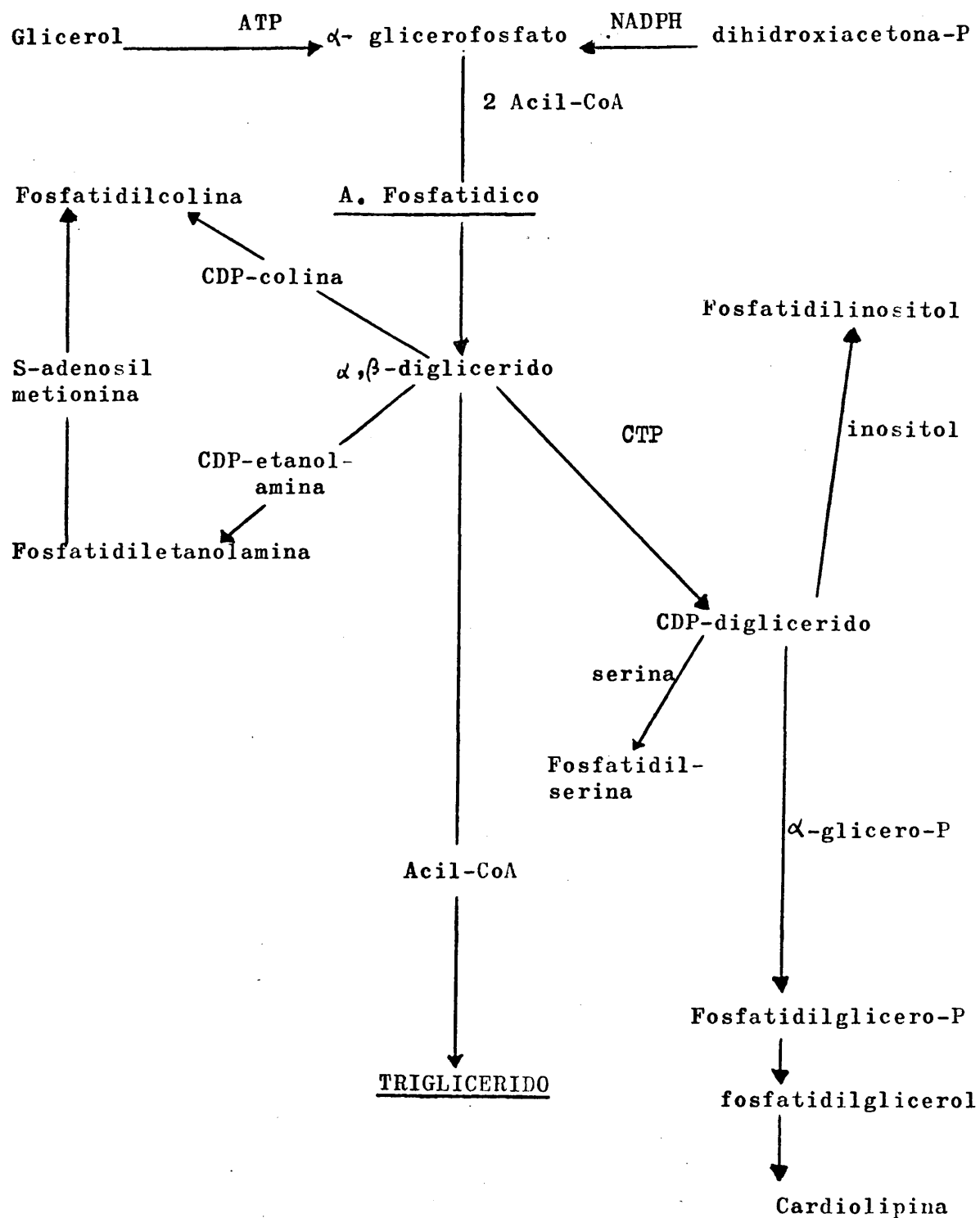


Figura 5.- Esquema de biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos. (Kennedy, 1961).

cesidad de pasar por la fase previa de ácido fosfatídico:

monoacilglicérido + Acil-CoA  $\rightleftharpoons$  diacilglicérido + CoA

En estudios recientes DCDDS y col. (1976) ponen de manifiesto que los glicerolípidos pueden ser sintetizados en el tejido adiposo desde glicero-fosfato, dihidroxiacetona-fosfato y monoacilglicerol, estos mismos autores pusieron de manifiesto, estudiando la síntesis lipídica en tejido adiposo de ratas sometidas a diferentes dietas, como influye esta modificación sobre la síntesis de triglicéridos en dicho tejido.

#### 1.6.- BIOSÍNTESIS DE FOSFOLÍPIDOS

Los principales fosfoglicéridos que sirven como componentes de las membranas y las lipoproteínas de transporte, se forman por ramificaciones de la ruta biosintética a partir del ácido fosfatídico (Fig. nº 3). La importancia central del ácido fosfatídico y de los nucleótidos de citidina en estos procesos fué descubierta por KENNEDY. Todas estas reacciones tienen lugar, principalmente, en el retículo endoplasmático.

Es importante considerar que la conversión microsomal de dihidroxiacetona a ácido fosfatídico puede estar influida por la dieta (ANANDA RAO y col. 1971).

La síntesis "de novo" de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina a partir del ácido fosfatídico puede tener lugar por dos mecanismos distintos, uno a través de diglicérido y otro a través de CDP-diglicérido. En el esquema adjunto se indica solamente el primero de ellos, ya que en los trabajos más recientes se discute la existencia

en animales superiores del otro mecanismo, que es sin embargo el que predomina en bacterias.

Varios autores (KANCCH y SINCLAIR 1973a; OHNO 1971; SUNDLER 1974) han comprobado en microsomas de hígado de rata la reversibilidad de la reacción catalizada por CDP-colina: 1,2-diacilglicerol-colina (y etanolamina) fosfotransferasas que da lugar a la formación de CDP-colina y CDP-etanolamina a partir de los fosfolípidos endógenos.

Igualmente KANCCH y OHNO (1973 b) han estudiado los 1,2-diglicéridos formados por inversión de dicha reacción a partir de lecitinas endógenas, en microsomas de hígado de rata, encontrando que estos 1,2-diglicéridos se degradan por la actividad microsomal; esta preparación celular posee actividad 1,2-diglicérido fosfoquinasa, que utiliza los 1,2-diglicéridos tanto endógenos como exógenos para formar ácidos fosfatídicos. Además, el análisis de los 1,2-diglicéridos formados indica que la colina fosfotransferasa puede utilizar en su reacción inversa el "pool" total microsomal de lecitinas, pese a su heterogeneidad metabólica y química. Por otra parte, los 1,2-diglicéridos formados a partir de lecitinas son reutilizados para la síntesis de fosfatidiletanolaminas y triglicéridos.

La fosfatidil-etanolamina es el precursor de la fosfatidil-colina, la cual se forma por transferencia de tres grupos metilo desde tres moléculas del donador de metilos S-adenosil-metionina al grupo amino del resto etanolamínico.

A partir del CDP-diglicérido y mediante reacciones catalizadas por una enzima específica, la porción ci-



tidin-monofosfato (CMP) es desplazado del CDP-diglicérido, por uno de los tres alcoholes siguientes: serina, inositol, y  $\alpha$ -glicerofosfato, formando fosfatidilserina, dosfatidilinositol y fosfatidilglicerofosfato.

El fosfatidilglicerofosfato es el precursor de dos interesantes clases de lípidos, que pueden desempeñar papeles especiales en los aspectos funcionales de las membranas. Por desfosforilación rinde fosfatidilglicerol, uno de los componentes principales de la membrana celular de muchas bacterias. La segunda clase de lípidos se origina por la reacción de una molécula de CDP-diglicérido para formar difosfatidil-glicerina, más corrientemente denominada cardiolipina, que constituye de modo característico, el 10% o más de los lípidos de la membrana mitocondrial.

La cardiolipina también es uno de los componentes principales de los lípidos de las membranas de muchas bacterias; parece que desempeña algún papel específico en relación con el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa en las mitocondrias y en las bacterias.

#### 1.7.- METABOLISMO DE LAS LIPOPRCTEINAS.

La digestión de los lípidos ingeridos en la dieta requiere la emulsión previa de los mismos por la bilis en el duodeno. La enzima más importante que interviene en proceso digestivo de estos compuestos, es lipasa pancreática; las lipasas gástricas y entéricas parecen desempeñar un papel secundario.

El principal lugar de absorción de los productos resultantes de la digestión de las grasas es el propio duodeno.

Los ácidos grasos que contienen menos de 10-12 átomos de carbono pasan directamente a la sangre portal desde las células de la mucosa y son transportadas como ácidos grasos libres. Los ácidos grasos que contienen más de 10-12 átomos de carbono se vuelven a esterificar en triglicéridos dentro de las células de la mucosa intestinal.

Los triglicéridos reconstituidos forman a continuación los quilomicrones que pasan a la linfa y son llevados a la circulación general a través del conducto torácico. El componente proteico de los quilomicrones parece ser sintetizado en la mucosa intestinal.

Ligado el endotelio capilar existe una lipoproteína lipasa que cataliza la liberación e hidrólisis de los triglicéridos de los quilomicrones. Los productos de la hidrólisis (DG y AGL) son tomados por tejidos extrahepáticos y el resto del quilomecrón es captado por el hígado. (JACKSON y col., 1976).

Los quilomicrones también pueden ser captados por el hígado, aunque, actualmente se considera que esta captación directa por los hepatocitos es mucho menos importante de lo que se creía hace algún tiempo. Se ha descubierto una triglicérido lipasa hepática (LA ROSA y col., 1972) y se ha demostrado que cataliza la hidrólisis de lipoproteínas ricas en triglicéridos (KRAUSS y col., 1973; ASSMAN y col., 1973).

Los lípidos que abandona el hígado se encuentran en forma de lipoproteínas. Las lipoproteínas mejor conocidas son las del plasma sanguíneo de los mamíferos; contienen tanto lípidos polares como neutros, así como colesterol y sus ésteres; su clasificación se basa en las diferentes densidades que presentan estas partículas (Tabla nº 6).

Fracción					
	Micrones del quilo	Densidad muy baja	Densidad baja	Densidad elevada	Densidad muy ele- vada
Densidad	<1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21	>1,21
S <sub>f</sub>	>400	12-400	0-12		
Diámetro, Å	5000-10000	300-700	200-250	100-150	100
Fracción elec- troforética	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_1$	$\alpha_1$	$\alpha_1$
Cantidad, mg/ /100 ml de plasma	100-250	130-200	210-400	50-130	290-40
Composición porcentual aproximada					
Proteínas	2	9	21	33	57
Fosfolípidos	7	18	22	29	21
Colesterol					
Libre	2	7	8	7	3
Ester	6	15	38	23	14
Triglicéridos	83	50	10	8	5
Acidos grasos	...	1	1		

Tabla nº 6 . Lipoproteínas del plasma humano. Adaptado por J.L. Oncley, en F. Homburger y P. Bernfeld, eds. "The Lipoproteins: Methods and Clinical Significance", S. Karger, Nueva Yorks, 1958.

La síntesis de las lipoproteínas comienzan cuando

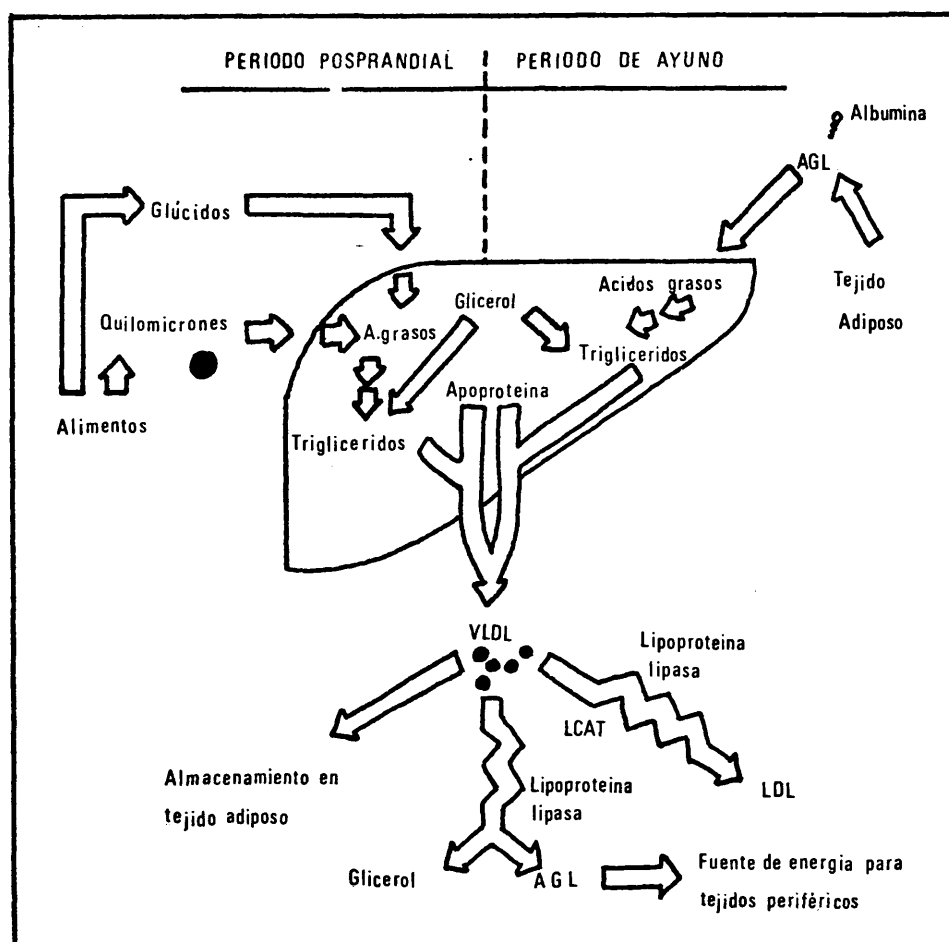
su parte proteica ya está formada (McCERJEA, 1969; LO y MARSH, 1970; BAR-ON y col., 1973; CHAPMAN y col., 1973). El componente proteico de la lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL), es sintetizado en los ribosomas de los hepatocitos y se une a un resto hidrocarbonado y a un fosfolípido. El resto de la fracción lipídica de estas lipoproteínas se une al complejo mencionado en el interior de los sacos endoplásmicos, antes de abandonar el hepatocito.

El mecanismo de secreción de las lipoproteínas es todavía desconocido. Los trabajos de perfusión de hígado con aminoácidos marcados, así como el estudio del destino metabólico de los lípidos y apoproteínas individuales (WINDMUELLER y SPAETH, 1957; RUDERMAN y col., 1968; CHAPMAN y col., 1973; EISENBERG y RACHMILEWITZ, 1973), sugieren que sólo las lipoproteínas VLDL son segregadas directamente por el hígado; las otras lipoproteínas se formarían a partir del catabolismo de la VLDL. Sólo un 10% aproximadamente de las VLDL del plasma son sintetizadas por la mucosa intestinal.

La fracción proteica de las lipoproteínas la constituyen las llamadas apoproteínas, separadas por procedimientos inmunquímicos, se clasifican en tres grandes grupos: apo-A, apo-B y apo-C. La apo-A se subdivide a su vez en dos polipéptidos distintos, apo-AI y apo-AII, y a la apo-C en tres polipéptidos diferentes. La apo-A es el componente proteico más abundante en las HDL, la apo-B en las LDL y la apo-C en las VLDL. Los quilomicrones contienen una pequeña cantidad de apoproteína siendo la apo-B y apo-C III las más abundantes.

El estudio de las apoproteínas ha aclarado muchos aspectos del metabolismo de las lipoproteínas, poniendo de

manifiesto entre otras cosas la relación precursor producto existente entre las VLDL y las LDL. La apo- de las VLDL es la única fuente de apoproteína de las LDL, según un proceso de conversión unidireccional realizado en el torrente circulatorio mediante la acción de la lipoproteína lipasa. De cada partícula de VLDL se forma una de LDL con producción previa de las IDL o lipoproteínas de densidad intermedia (BLUM y LEVY, 1975).



Esquema del metabolismo de las lipoproteínas.

## 1.8.- REGULACION DEL METABOLISMO LIPIDICO.

### 1.8.1.- Regulación de la síntesis de triglicéridos en hígado.

En 1961 FRITZ propuso como el principal factor de la regulación del metabolismo de los ácidos grasos en el hígado, la disponibilidad de glicero-fosfato. Sin embargo, aunque existen evidencias de que la concentración de glicero-fosfato disminuye en ayuno, no ocurre lo mismo con otras situaciones en las que la síntesis de triglicéridos hepáticos está considerablemente inhibida (diabetes p. e.) (WILLIAMSON, 1973).

En efecto, la concentración hepática de glicero-fosfato depende principalmente de tres factores:

- 1) de la disponibilidad de triosas fosfato.
- 2) del estado redox NAD/NADH citoplasmático.
- 3) de los niveles de fosforilación del glicerol plasmático por la gliceroquinasa hepática.

Cabe esperar pues, que el control de la esterificación sea más específico y no dependa, salvo en condiciones muy especiales, de la disponibilidad de glicero-fosfato.

En efecto, el control de la esterificación de los ácidos grasos en el hígado puede depender de otros factores, como son:

- a) la actividad de la glicero-fosfato-acil transferasa.
- b) la velocidad de la lípisis de los triglicéridos hepáticos.
- c) la actividad de los sistemas acil-carnitin-transferasas.

La actividad de la glicerol-fosfato acil-transferasa ha sido estudiada en homogenados y en fracciones subcelulares y submitocondriales de hígado de rata. La enzima tiene una doble localización intracelular, encontrándose más de la mitad de la actividad total en las mitocondrias y el resto en la fracción microsomal (DAAE y BREMER, 1970). El fraccionamiento de las mitocondrias puso de manifiesto que la acilación del glicerol-fosfato tenía lugar fundamentalmente en la membrana externa, donde a su vez tiene lugar la activación de los ácidos grasos por la acil-CoA sintetasa (DAAE y BREMER, 1970).

Durante el ayuno y bajo una dieta rica en grasas, la actividad de la glicerol fosfato acil-transferasa se encuentra disminuida, y alcanza sus valores normales tras una realimentación con glucosa. Estos resultados han conducido a proponer el siguiente esquema fisiológico (AAS y DAAE, 1971):

Durante el ayuno y bajo una dieta rica en grasas, cuando los ácidos grasos de larga cadena son la principal fuente de energía y el anabolismo lipídico es bajo, la actividad de la glicerofosfato-acil transferasa es baja, siendo máximos los niveles de activación y de oxidación de los ácidos grasos en hígado. Durante la realimentación con glucosa, cuando el hígado utiliza fundamentalmente los glúcidos y repone la reserva lipídica, la actividad de la glicerofosfato-acil transferasa es alta, siendo máxima la acilación del glicerofosfato. Así pues, estos cambios de las actividades enzimáticas bajo diferentes condiciones nutritivas pueden controlar el destino de los ácidos grasos en el hígado.

Se ha sugerido también la existencia de un ciclo he

pático triglicéridos/ácidos grasos, catalizado por la triglicérido lipasa (sensible a hormonas) y las correspondientes enzimas esterificantes (WILLIAMSON y HEMS, 1970). En este caso, la esterificación podría estar controlada por la velocidad de la lipólisis. Sin embargo, estudios con ácidos grasos marcados, en hígado perfundido, sugieren que la esterificación es más intensa que la lipólisis, dado que cambios en esta última tienen poco efecto sobre el nivel de la esterificación (MAYES, 1970).

#### 1.8.2.- Influencias hormonales sobre el metabolismo lipídico.

##### 1.8.2.1.- Receptores hormonales y mensajeros intracelulares

De la investigación realizada en la última década han surgido dos principios básicos de la acción hormonal. El primero consiste en que las células que responden a una determinada hormona, contienen receptores hormonales específicos que son unas proteínas especializadas capaces de fijar a la molécula de la hormona con gran afinidad y especificidad. Tales receptores hormonales se encuentran en la célula tan sólo en ínfimas cantidades. En las células que responden a las hormonas hidrosolubles, tales como la adrenalina, el glucagón y la insulina, que no atraviesan las membranas con facilidad, los receptores hormonales están localizados en la superficie celular. En las células que constituyen el objetivo de las hormonas sexuales y del cortex adrenal que por ser esteroides liposolubles, pueden pasar a través de la membrana, los receptores primarios se encuentran situados en el interior del citosol.

El segundo principio se refiere a que la unión -



de la hormona a su receptor específico provoca la formación intracelular de una molécula mensajera que estimula (o deprime) alguna actividad bioquímica característica del tejido específico de la hormona. Para las hormonas polares, solubles en el agua, como la adrenalina y el glucagon, el mensajero intracelular es el AMP-cíclico, que a menudo recibe el nombre de segundo mensajero. En el caso de las hormonas esteroides liposilubles, el propio complejo hormona receptor se convierte en el mensajero intracelular.

Aunque el AMP-cíclico constituye el segundo mensajero en la acción de muchas hormonas, sólo se dispone de una imagen bien definida de la cadena completa de fenómenos del proceso regulador en los casos de las actuaciones de la adrenalina y el glucagon en el hígado.

#### 1.8.2.2.- Movilización de los lípidos de depósito.

La movilización de las grasas desde el tejido adiposo de mamíferos está incrementada por varias hormonas lipolíticas, las cuales activan la HSL (lipasa sensible a hormonas) del adipocito vía proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (KHOO y col., 1973; KHOO y STEINBERG, 1975), (Fig. nº 7).

La HSL cataliza la etapa limitante ( $TG \rightarrow DG + AGL$ ) en la hidrólisis de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres, resultando la liberación de estos últimos a través del plasma para su utilización en los tejidos. La HSL es el factor principal en el control de la movilización de los lípidos en los mamíferos.

El paso de los ácidos grasos a través de la mem-

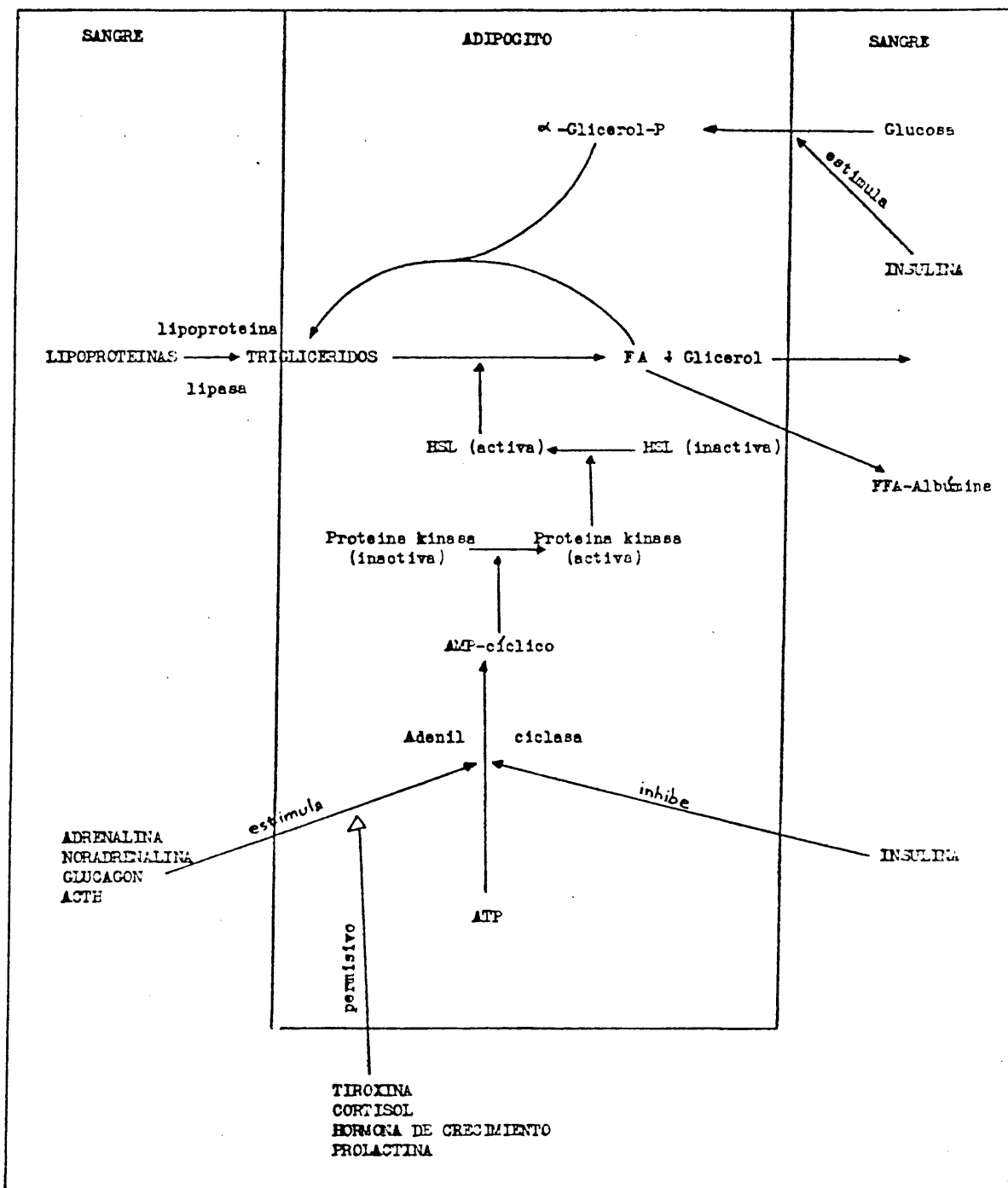


Figura 7. Esquema de la movilización de los lípidos desde el tejido adiposo de mamíferos.

brana citoplasmática se realiza por simple difusión a favor de gradiente y, por tanto, es proporcional a su concentración en el adipocito. Los niveles de ácidos grasos en sangre deberían depender por tanto, exclusivamente, de la actividad lipolítica del tejido. Sin embargo, el proceso de reesterificación de los ácidos grasos puede jugar un importante papel en la regulación de su movilización. En efecto, si la lipólisis tiene lugar sin esterificación, cada molécula de glicerol liberada iría acompañada de tres ácidos grasos. Sin embargo, experiencias "in vitro" de incubaciones de panículos adiposos demuestran que se libera mucho más glicerol que ácidos grasos, lo que indica que una gran cantidad de ácidos grasos son nuevamente esterificados. La simultaneidad de la lipólisis y de la esterificación en el tejido adiposo ha sido confirmada en experiencias realizadas con glucosa marcada, en las que se ha detectado radiactividad tanto en los triglicéridos internos como en el glicerol y en los ácidos grasos liberados por el tejido. Se ha concluido, por tanto, que en el tejido adiposo opera el denominado ciclo triglicéridos/ácidos grasos (NEWSHOLME y START, 1973), (Fig. nº8).

Una de las ventajas que presenta dicho ciclo es el tener una mayor sensibilidad en el control, dado que la activación o inhibición de uno de los procesos se traduce automáticamente en la inhibición o activación del contrario. Pero el ciclo triglicéridos/ácidos grasos presenta además otra ventaja que le es exclusiva. En efecto, el ciclo es capaz por sí mismo de controlar los niveles plasmáticos de la glucosa y de los ácidos grasos, sin necesidad de la intervención hormonal.

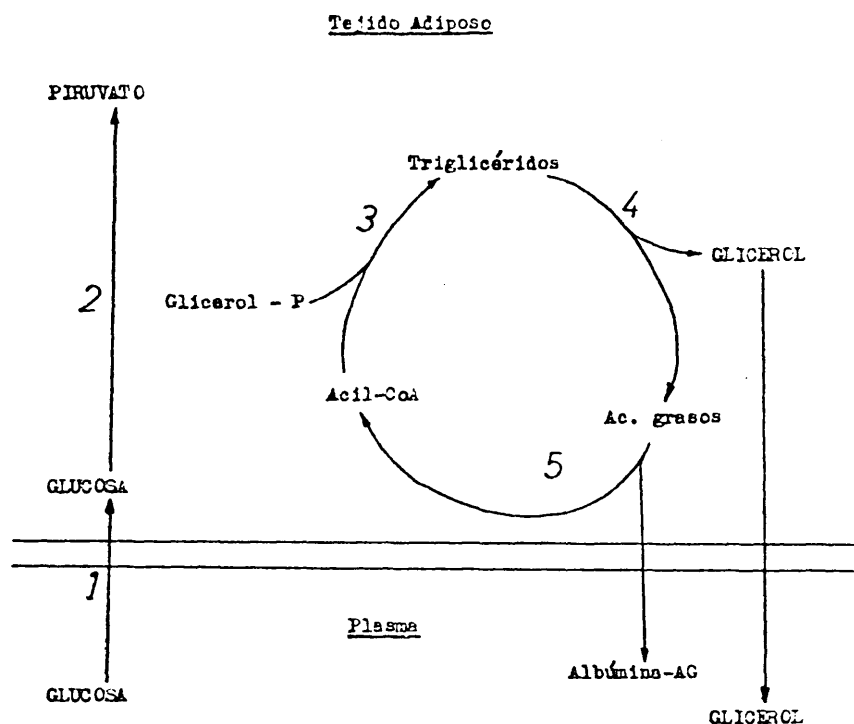


Figura 8. Ciclo triglicéridos/ácidos grasos en tejido adiposo (Newsholme y Start, 1973).

(1) Transporte de la glucosa a través de la membrana celular. (2) Glucólisis. (3) Esterificación. (4) Lipólisis. (5) Activación de los ácidos grasos.

Supongamos, por ejemplo, que debido a un gasto energético excesivo se produjera una caída de los niveles de la glucemia. En este caso, la esterificación en tejido adiposo, dependiente de glicero-fosfato y por tanto de la glucólisis, disminuiría inmediatamente y, supuesto que el nivel de la lipólisis permanece constante, se produciría un aumento de los niveles intracelulares de ácidos grasos, que serían liberados en sangre. De esta manera, la liberación de ácidos grasos se produce por una caída de la glucemia, mientras que si, por el contrario, éstos aumentaran, se aceleraría la esterificación, lo que se traduciría en la disminución de la movilización de los ácidos grasos.

Sin embargo, el pequeño margen de variación de la glucemia en animales superiores sugiere que los mecanismos de regulación deben ser necesariamente más complicados que los que el ciclo triglicéridos/ácidos grasos postula. Por otra parte, es sugestivo pensar que seres evolutivamente menos avanzados podrían regular el acúmulo y utilización de su reserva grasa por esquemas tan sencillos como los que sugiere el ciclo triglicéridos/ácidos grasos.

#### 1.8.2.3.- Control hormonal de la esterificación.

Dado que, en los animales superiores, las oscilaciones de la glucemia no pueden explicar las variaciones del balance entre esterificación e hidrólisis de triglicéridos, es necesario admitir que el proceso está sometido al control hormonal. Así, la disminución de la glucemia en ratas tras 48 h. de ayuno, es sólo de un 30%, lo que parece insuficiente para incrementar la lipólisis según las previsiones del ciclo triglicéridos/ácidos grasos. Sin embargo, en estas condiciones los niveles plasmáticos de in-

ulina caen en un 80% (HALES y RANDLE, 1963), lo que sí puede afectar muy significativamente al balance lipólisis/lipogénesis en tejido adiposo.

Es necesario destacar aquí que la caída de los niveles de insulina durante el ayuno se considera debido más a la falta de estímulo de la ingesta sobre la secreción de hormonas duodenales, que a la caída del 30% en los niveles de la glucemia. En efecto, la administración oral de glucosa origina mayores subidas en los niveles de insulina que el suministro intravenoso de la misma (PERLEY y KIPNIS, 1967).

#### 1.8.2.3.1.- Efecto de la insulina.

Los múltiples efectos metabólicos de la insulina se pueden resumir en dos tipos de acción. Una a nivel de la membrana celular favoreciendo el transporte de glucosa, aminoácidos y potasio. La otra acción es intracelular sobre diversas enzimas, acción que en algunos casos es mediada por variaciones del AMP cíclico.

La activación del transporte de la glucosa en la membrana celular tiene **lugar** en las células musculares y adipocito, pero no en el cerebro, intestino, riñón, hepatocito ni en las células beta del páncreas. La insulina se combina con un receptor de la membrana y de su reunión resulta la activación del sistema de transporte de aminoácidos hacia el interior de la célula muscular, adipocito y también del hepatocito.

En el músculo, la insulina también favorece la

entrada de potasio, elevando el potencial de membrana de la célula muscular. Por el contrario en el adipocito, - la insulina inhibe la entrada de potasio.

Además de la acción sobre la membrana, la insulina posee una acción molecular, a pesar de que no penetra dentro de la célula. En primer lugar estimula la síntesis proteica y de DNA independientemente del aumento de concentración de aminoácidos. También facilita la síntesis de - glucogenosintetasa y de diversas enzimas de la glucólisis. En tercer lugar provoca una disminución del AMP cíclico y a través de este mecanismo inhibe la lipólisis, - la glucogenolisis y la gluconeogénesis, procesos todos ellos que necesitan de un sistema de activación en el que interviene el AMPc.

En conjunto las acciones biológicas de la insulina no pueden atribuirse a un solo mecanismo, pero en todo caso es necesario que las células estén intactas puesto que el receptor hormonal se encuentra localizado a nivel de la membrana celular.

En resumen, se considera a la insulina responsable del control de la esterificación en el tejido adiposo por las siguientes razones:

- Controla el transporte de la glucosa al interior del adipocito y, por tanto, los niveles de glicero-P del tejido adiposo. En efecto, debido a la caída de la insulina en el ayuno, el aporte de glucosa está disminuido, bajo los niveles de glicero-P, y, por consiguiente, inhibida la esterificación.

- Activa la lipoproteína lipasa en tejido adiposo y, por tanto, facilita la utilización de los triglicéridos. Este aumento de la actividad parece ser debido más a un aumento de su síntesis que a un incremento de su eficiencia catalítica. Es posible que el aumento de actividad de la lipoproteína lipasa sea debido al descenso de los niveles de AMPc postulado por WING y ROBINSON (1968).

- Controla la biosíntesis de ácidos grasos por un mecanismo independiente del transporte de glucosa. En efecto, YUNGAS (1970-1972) y DENTON y WEIS (1971) han demostrado una activación de la piruvato deshidrogenasa por insulina.

- Inhibe la lipólisis favoreciendo la estereoficiación (FAIN y ROSENBERG 1972).

#### 1.8.2.3.1.1.- Efecto sobre la síntesis hepática de ácidos grasos.

Se ha visto anteriormente (1.3.1) que la lipogénesis hepática está inhibida en ratas sometidas a ayuno y en ratas a las que se ha provocado diabetes aloxánica, y que esta inhibición es debida a una disminución en los niveles de acetil-CoA carboxilasa (MAJERUS y KILBURN, 1969; NAKANISHI y NUMA, 1970) y de ácido graso sintetasa (BURTON y col., 1969; GONCALVES y col., 1972).

HAFT (1967) ha encontrado que cuando se perfunde hígado de rata con concentraciones fisiológicas de glucosa, la adición de insulina al medio de perfusión incrementa la incorporación de acetato-<sup>3</sup>H y glucosa- <sup>14</sup>C a ácidos grasos totales de hígado. Un resultado análogo ha si-



do obtenido por WILLIAMSON y col., (1966) en la perfusión de hígado de rata sometida a ayuno.

Un mecanismo probablemente importante en el control de la biosíntesis hepática de ácidos grasos "in vivo" es el ejercido por los ácidos grasos libres y el glicerol del plasma y sus metabolitos hepáticos. Por otra parte, las investigaciones llevadas a cabo acerca de la influencia de la insulina sobre la lipogénesis hepática (SWEENEY y ASHMORE, 1965; BEWSHER y col., 1966) sugieren que la insulina puede incrementar de forma rápida la síntesis de ácidos grasos en el hígado, mediante una acción que es primariamente hepática aunque puede estar potenciada "in vivo" por otros efectos extrahepáticos de la hormona; por ejemplo, su antilipolisis. Esta acción, cuya localización debe ser ajena a las rutas metabólicas de la glucosa, parece tener lugar a nivel de la propia síntesis de ácidos grasos. En este sentido son muy significativos los trabajos de BRICKER y LEVEY (1972) y de ALLRED y ROEHRIG (1973) que ponen de manifiesto que, en hígado de rata, la lipogénesis hepática a partir de acetato se inhibe por AMP cíclico y su dibutiril derivado, y que esta inhibición tiene lugar a nivel de la acetil-CoA carboxilasa. Esto sugiere que la activación de la lipogénesis hepática por insulina puede ser mediada por el AMP cíclico.

En efecto, a largo plazo, los efectos del hiperinsulinismo "in vivo" sobre la lipogénesis hepática en animales normales no diabéticos ha recibido relativamente poca atención, pese a su indudable importancia. Quizá donde los efectos de un hiperinsulinismo crónico son mejor observados en relación con la lipogénesis, es en los animales con obesidad experimental o hereditaria, siendo el más representativo de ellos el ratón con síndrome obeso-hiper glucémico hereditario; en estos animales el metabo-

lismo lipídico es claramente anormal y estas alteraciones pueden considerarse como secundarias a la excesiva e incontrolada secreción de insulina. En estos animales, la síntesis hepática de ácidos grasos a partir de acetato (WINAND y col., 1968), citrato (HOWARD y LOWENSTEIN, 1965) y glucosa (JANSEN y col., 1967) está incrementada varias veces con relación a los animales normales y permanece elevada incluso durante el ayuno. Esta estimulación de la lipogénesis hepática es debida a las elevadas actividades de la citrato liasa (KORNACKER y LOWEINSTEIN, 1964), de la acetil-CoA carboxilasa y de la ácido graso sintetasa (CHANG y col., 1967). También, como es de esperar, debido a los elevados niveles de insulina en plasma, la actividad de la glucoquinasa hepática y otras enzimas clave de la glicol<sup>í</sup>sis es también muy superior a la normal (SEIDMAN y col., 1967).

#### 1.8.2.3.1.2.-Efecto sobre la síntesis de triglicéridos de hígado y plasma.

Se ha citado anteriormente que el efecto anti-lipolítico de la insulina debe ser el principal responsable del descenso de los niveles de ácidos grasos libres y glicerol en suero, que se produce después de la administración de insulina "in vivo". Aunque algunos autores proponen que ésta es la única causa responsable de dicho efecto (WEST y PASSEY, 1967), otros investigadores consideran que existe además un efecto adicional debido a que la insulina estimula la captura por el hígado de los ácidos grasos libres del plasma (PENHOS y col., 1968).

Como consecuencia de estas acciones extrahepáticas de la insulina, disminuye la aportación de precurso-

res, procedente del plasma, para la síntesis hepática de triglicéridos. Si este efecto no es compensado por un incremento en la lipogénesis hepática y en la formación de  $\alpha$ -glicero - fosfato endógeno, se producirá un descenso en la producción de triglicéridos en el hígado y en su secreción en el plasma en forma de lipoproteínas, aunque la insulina no actúe directamente sobre esta última etapa. Los estudios llevados a cabo en la rata (RUBENSTEIN y RUBENSTEIN, 1966) y en seres humanos (CSCORBA y col., 1966; NESTEL, 1967) sugieren que ninguno de los pasos metabólicos que tienen lugar en la transformación de ácidos grasos libres del plasma en triglicéridos plasmáticos es controlado directamente por la insulina, por lo que el descenso de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, provocado por la acción antilipolítica de la insulina, determina un descenso paralelo en la secreción de triglicéridos hepáticos en el plasma.

#### 1.8.2.4.- Control hormonal de la lipólisis.

Frente al protagonismo de la insulina en la regulación de la esterificación, el control de la lipólisis está más diversificado, afectándole además de la insulina otras hormonas, como son las catecolaminas, el glucagón y la hormona de crecimiento. La actividad lipolítica dependerá por tanto de los niveles plasmáticos de estas hormonas, que a su vez son consecuencia del estado fisiológico del animal.

##### 1.8.2.4.1.- Efecto de las catecolaminas.

En condiciones de "stress", se produce una movilización de los ácidos grasos como consecuencia de la acción de la adrenalina. En efecto, la administración de di

cha hormona aumenta la concentración (y la velocidad de recambio) de los ácidos grasos y del glicerol plasmáticos, con independencia del estado fisiológico del animal. (VAUGHAN y STEINBERG, 1963). Este hecho, unido al inequívoco efecto de las catecolaminas "in vitro" (BUTCHER y col., 1965 ; BUTCHER y SUTHERLAND, 1967), sugiere que la lipólisis provocada por el stress es mediada por la adrenalina y/o la noradrenalina.

Igualmente, el aumento de la lipólisis por estimulación eléctrica del tejido adiposo puede ser explicado por liberación de noradrenalina en las terminaciones nerviosas.

La adrenalina actúa tanto en músculo, hígado y tejido adiposo; aumentando los niveles de AMP cíclico. - Fueron BUTCHER y col. (1965) los que demostraron que efectivamente la adrenalina incrementaba los niveles de AMP cíclico en tejido adiposo aislado. Este incremento se debía, además, a la estimulación del sistema adenilato ciclasa, puesto que cuando se destruía la membrana del adipocito desaparecía el efecto de las catecolaminas sobre la lipólisis, Igual efecto producirían los agentes  $\beta$ -adrenérgicos, inhibidores del sistema adenilato ciclasa (BUTCHER y col., 1965). Además, la cafeína (conocido inhibidor de la fosfodiesterasa) resultó ser sinérgico de la adrenalina en la estimulación de la lipólisis (VAUGHAN y STEINBERG, 1963). Por último, la presencia de dibutiril-AMP-cíclico en incubaciones de células adiposas, produce un incremento en la liberación de ácidos grasos al medio de incubación (SUTHERLAND y BUTCHER, 1965).

#### 1,8.2.4.2.- Efecto de la hormona de crecimiento.

El efecto de la hormona del crecimiento so

bre la lipólisis, es idéntico al de las catecolaminas. A diferencia de las catecolaminas que estimulan la lipólisis en cuestión de minutos, la respuesta a la hormona del crecimiento se produce con un retraso de aproximadamente una hora. Esto sugiere que la hormona del crecimiento tiene un mecanismo de acción diferente de las catecolaminas. Así, mientras la adrenalina activaría la triglicérido lipasa, merced a un aumento de los niveles de AMP-cíclico, como consecuencia de una activación de la adenil-ciclasa, la hormona del crecimiento lo haría mediante la inducción de la síntesis de adenil ciclase. En efecto, la estimulación de la lipólisis por hormona del crecimiento se bloquea por inhibidores de la síntesis de las proteínas, lo que sugiere que la activación se debe a un aumento de la enzima "de novo". Además, el hecho de que la lipólisis se incremente por hormona del crecimiento y por glucocorticoides una vez activada por adrenalina, condujo a proponer que la hormona del crecimiento actuaría induciendo la síntesis de adenil ciclase (FAIN y SIPERSTEIN, 1970). Estos resultados serían concordantes en la lenta acción de dicha hormona.

#### 1.8.2.4.3.- Efecto de la insulina.

La acción de la insulina sobre la esterificación podría explicar por sí mismo el efecto inhibitorio que presenta sobre la movilización de los ácidos grasos. Sin embargo, diversos hechos experimentales obligan a proponer un efecto directo antilipolítico (HAVEL, 1965). Así, la inyección de insulina decrece el nivel y la velocidad de re cambio del glicerol en sangre en animales ayunados o diabéticos. Igualmente la insulina inhibe la liberación de glicerol en tejido adiposo "in vitro" (YUNGAS y BALL, 1963).

Este efecto puede minimizar la acción de los agentes lipolíticos más directos, los cuales sólo podrían ejercer su acción cuando los niveles de insulina fuesen bajos. De esta manera, la caída de los niveles de insulina durante el ayuno, permitiría actuar a las hormonas lipolíticas aún - cuando sus niveles no se hayan incrementado todavía en san gre. En este sentido, SCOW y CHERNICK (1970) han demostrado que la insulina inhibe la lipólisis en tejido adiposo - procedente de ratas alimentadas o en ayunas durante 24 h. pero no cuando el ayuno es de 48 h.

En cuanto al mecanismo de acción antilipolítica de la insulina, BUTCHER y col. (1966) han demostrado en incubados de pániculo graso, que la insulina disminuye los niveles intracelulares de AMP-cíclico previamente umenta dos por la presencia de catecolaminas. Sin embargo, se des conoce cómo la insulina puede disminuir los niveles de AMP cíclico normales en tejidos de animales alimentados. En es te sentido, LOTEN y SNEYD (1970) parecen haber demostrado que la insulina estimula la fosfodiesterasa en tejido adi poso, mientras que RENNER y col. (1974) sugieren que inhi be la adenil-ciclase.

#### 1.8.2.4.4.- Efecto del glucagón.

El mecanismo de acción del glucagón sobre la lipólisis se realiza a través de la estimulación de la adenilato ciclase, la cual pone en funcionamiento un mecanismo en cascada que termina en una triglicérido lipasa fosforilada activa que hidroliza la reserva de triglicéridos del tejido adiposo (RODBELL y col., 1972). En la figura - nº 9 se muestra dicho mecanismo, modificado por STEINBERG y HUTTUNEN (1972) y recogido por LEFEBVRE (1975).

En efecto, la inyección de glucagón ocasiona, en el hombre, una momentánea caída de los niveles de ácidos grasos, seguida de una subida posterior. Esta caída inicial se ha intentado explicar por la simultánea activación de la glucogenolisis hepática. En efecto, la glucogenolisis ocasiona una momentánea hiperglucemia, y por tanto un mayor aporte de glucosa al tejido adiposo. Parte de esta glucosa sería utilizada para producir glicerol fosfato, lo que aumentaría la esterificación y explicaría el retraso de la liberación de ácidos grasos plasmáticos. Sin embargo, este retraso no se produce en el perro, donde aumentan los niveles de ácidos grasos inmediatamente después de la administración de glucagón, si bien el tratamiento no modifica la glucemia (LEFEBVRE, 1966).

Por tanto, parece probado que el glucagón aumenta la lipólisis "in vivo" aunque con cinéticas diferentes según las especies. Tal efecto podría ser importante en ayuno, donde los niveles de glucagón se encuentran muy aumentados (LAURENCE, 1966).

El papel fisiológico del glucagón durante el ayuno podría ser, en principio, inducir la glucogenolisis y una vez agotado el glucógeno, se haría patente su acción lipolítica. Ahora bien, paralelamente la insulina cae durante el ayuno y el cociente insulina/glucagón tiende a disminuir. Sin embargo, cuando el tejido adiposo de rata ha sido incubado con diferentes concentraciones de insulina y glucagón, la lipólisis aumenta sus valores basales sólo cuando el cociente insulina/glucagón es igual o inferior a 0,2 (LEFEBVRE y LUYCK, 1969). Dicho valor no es probable que se alcance "in vivo", por lo que LEFEBVRE (1975) sugiere que, aunque la insulina parece ser la única hormo-

na antilipolítica, existen diversas hormonas lipolíticas que pueden potenciar su acción durante el ayuno, por lo - que el cociente que ha de considerarse en lo que a tejido adiposo se refiere es insulina/glucagón más otras hormonas lipolíticas.

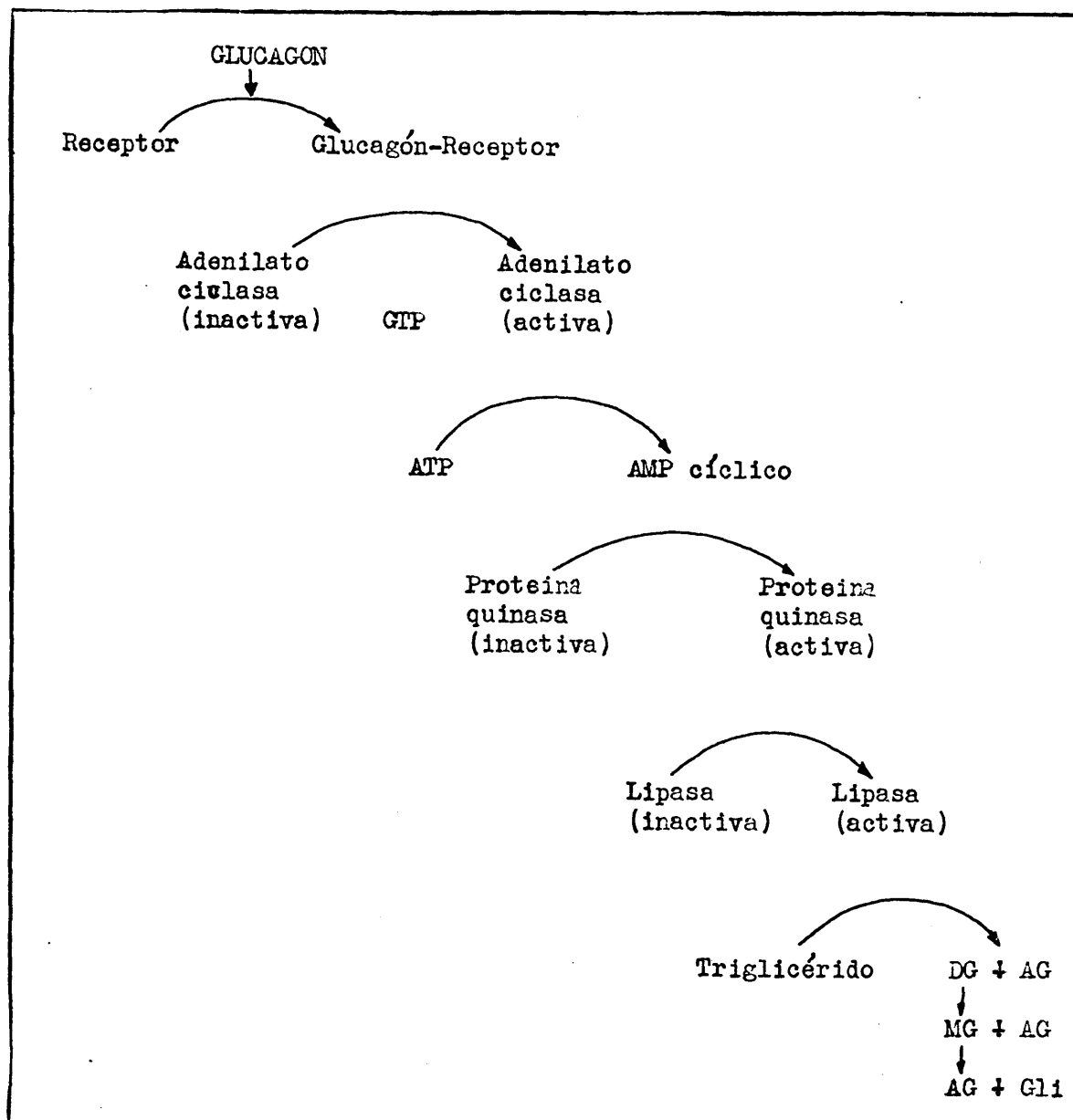


Figura 9. Mecanismo de inducción en cascada de la lipólisis por glucagón (Steinberg y Huttunen, 1972).



## 1.9.- METABOLISMO LIPIDICO DURANTE LA GESTACION.

Durante la gestación hay cambios significativos en el metabolismo de los lípidos y de los hidratos de carbono; son más patentes en las pacientes que sufren diabetes mellitus, en las cuales la gestación impone un mayor stress y, por tanto, incrementa las manifestaciones clínicas y bioquímicas de la diabetes. Frecuentemente los signos clínicos de la diabetes aparecen inicialmente durante la gestación para remitir al mínimo sólo cuando la gestación ha terminado.

Durante la gestación los requerimientos para la secreción de insulina están marcadamente incrementados. Cuando hay una deficiencia de insulina, debida a la diabetes, los requerimientos de esta hormona aumentan, pero el páncreas no puede responder a esta carga. Como resultado de ésto, el paciente es más susceptible a la hiperglucemia, cetosis y otras complicaciones de la gestación.

Las profundas alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos e insulina durante la gestación dependen en gran medida de los cambios hormonales inducidos sobre la madre por la unidad feto-placentaria.

### 1.9.1. Influencias hormonales.

#### 1.9.1.1. Hormonas placentarias.

La gestación plantea un gran número de problemas metabólicos tanto para la madre como para el desarrollo del feto. La madre acumula los nutrientes exógenos mientras el feto no demande un aporte de ellos, pero en cuanto ésto ocurre su aporte debe ser mantenido constante

(FREINKEL, 1976), incluso durante los períodos de ayuno.

Durante la gestación el peso de la madre aumenta conforme al crecimiento del feto (SCOW y col., 1964, KUMARESAN y TURNER, 1968). El hígado aumenta de tamaño y se produce retención de nitrógeno (POO y col., 1939; ZUSPAN y GOODRIN, 1968). Por otra parte, el catabolismo está acelerado, con aumento de la movilización de las grasas y frecuentemente cetosis (SCOW, 1964; BERGMAN y SELLERS, 1960).

Estos complejos cambios metabólicos son inducidos por el desarrollo de la unidad feto-placentaria, y un gran número de ellos dependen de los cambios graduales en la endocrinología materna, debido a la secreción directa de hormonas placentarias a través de la circulación materna.

Durante la gestación, la placenta produce grandes cantidades de gonadotropina coriónica, estrógenos, - progesterona y hormona lactógena placentaria; las tres - primeras, y quizás también la cuarta, son indispensables para que continúe el embarazo.

#### 1.9.1.1.1.- Hormonas esteroídicas.

La producción diaria de estrógenos placentarios hacia el final de la gestación aumenta hasta hacerse 300 veces mayor que la producción diaria a mitad de un ciclo sexual normal.

Todas las enzimas necesarias para la síntesis total de colesterol y subsecuentemente de progesterona están presentes en la placenta (RYAN y col., 1966).

Existe una considerable evidencia de que los anticonceptivos orales pueden alterar la tolerancia a los hidratos de carbono (GERSHBERG y col., 1964; KALKHOFF y col., 1968; BECK y WELLS, 1960), pero la acción de la progesterona por sí misma sobre el metabolismo de estos compuestos está menos clara.

BECK (1969) demuestra que el tratamiento continuado con progesterona en monos determina una exagerada -respuesta insulínica a la glucosa administrada por vía intravenosa. También en el hombre la progesterona tiene efectos catabólicos sobre el metabolismo de las proteínas (LANDAN y LUGIHLL, 1961 y 1967).

KIYOHISA UCHIDA (1976) realiza un estudio de -los efectos de los progestágenos esteroidicos sintéticos sobre los lípidos hepáticos y del suero en ratas; dichos efectos se clasifican en dos grupos, el de los derivados tipo 19-nortestosterona y el de los derivados tipo 17  $\alpha$ -hidroxiprogesterona. El primero causa un descenso de los niveles de lípidos en el suero con un incremento de las -pre- $\beta$ -lipoproteínas y un descenso de las  $\alpha$ -lipoproteínas. El segundo grupo casi no cambia o incrementa muy poco los niveles lipídicos del suero, con un descenso de las pre- $\beta$ -lipoproteínas y un incremento de las  $\alpha$ -lipoproteínas.

Las enormes cantidades de estriol producidas durante la gestación dependen también de ciertos precursores suministrados a la placenta por el feto.

Los estrógenos sintéticos, tales como el mestranol, producen intolerancia a los hidratos de carbono en el postparto, en mujeres que han manifestado diabetes subclí-

nica durante la gestación (BECK y WELLS, 1969). Es posible que los estrógenos actúen igual que los glucocorticoides y aumenten los requerimientos para la secreción pancreática de insulina (WEFF y col., 1952; PERLEY y KIPNIS, 1969); sin embargo parece más probable que los estrógenos induzcan resistencia al transporte de glucosa en los tejidos periféricos (RIDDIC y col., 1962; BECK y WELLS, 1969), conduciendo así a un descenso de la sensibilidad del organismo a la acción hipoglucémica de la insulina.

Además de estriol y progesterona han sido descubiertas en placenta pequeñas cantidades de corticosteroides y aldosterona (NEHER y STARK, 1961), aunque no es probable que la producción de algunos de estos compuestos - fuera lo suficientemente alta como para cambiar algún aspecto del metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos durante la gestación.

Aunque la cantidad precisa de cada una de estas hormonas para inducir los cambios metabólicos durante la gestación no ha sido establecida, parece probable que su - continua interacción con el lactógeno placentario humano (HPL), pueda estar implicada en la lipólisis, en el incremento plasmático de AGL, en la hiperplasia pancreática y en la insensibilidad a la insulina durante este estado fisiológico (HERRERA, 1969).

#### 1.9.1.1.2.- Lactógeno placentario

En 1962, JOSIMOVICH, aisló de la placenta humana una proteína con propiedades semejantes a las de la - prolactina y a la STH, que denominó "lactógeno placentario humano" (HPL). KAPLAN y GRUMBACH confirmaron la existencia de esta hormona placentaria, para la que propusieron el -

nombre de "somatotropina-prolactina coriónica" (CGP). En una comunicación conjunta de los autores dedicados a este tema se ha propuesto para esta hormona el nombre de "somatomamotropina coriónica humana" (HCS), en el que se tiene en cuenta su lugar de síntesis y sus actividades somatotrópica y lactogénica.

La HPL sólo está presente en plasma de mujeres gestantes o en el suero de pacientes con tumores trofoblásticos (BECK, 1965). Es probablemente responsable de la actividad lipolítica plasmática de la gestación (BLEICHER, 1964).

KNOPP y col. (1973), en sus experiencias sobre tejido adiposo de rata, ponen de manifiesto que, en la segunda parte de la gestación, se libera somatotropina coriónica, provocándose una acción antagónica de la insulina, lo cual trae como consecuencia un aumento de la movilización de ácidos grasos, así como una disminución en el consumo de glucosa, que a su vez es utilizada por el feto.

En humanos, la HPL aparece primero en plasma, no antes de las tres primeras semanas de gestación, alcanza niveles máximos al final y rápidamente decrece después del parto.

Tiene en común con la hormona de crecimiento, ciertas propiedades físico-químicas, tales como el tamaño, composición en aminoácidos, compartimiento electroforético y actividad inmunológica (CATT y col., 1967; JOSIMOVICH y col. 1963). Las propiedades biológicas de la HPL son también similares a las de la hormona de crecimiento; sin embargo su potencia es mucho menor.

FRIESEN (1965) demuestra que la HPL incrementa el peso del cuerpo en ratas hipofisectomizadas y FLORINI y col. (1966) muestran que potencializa el efecto de una pequeña dosis de hormona de crecimiento sobre la ganancia de peso. GRUMBACH y col. (1966) muestran que la HPL incrementa la concentración de ácidos grasos libres en niños - con hipopituitarismo; sin embargo BECK y DAUGHADAY (1967) no observan cambio alguno en los ácidos grasos libres del plasma tras la inyección intravenosa de HPL a adultos normales.

TURTLE y KIPNIS (1967) muestran "in vitro" que la HPL acelera la lipólisis en tejido adiposo y que potencializa la acción lipolítica de una pequeña cantidad de hormona de crecimiento. RISSI y col. (1966) demostraron de forma consistente que la HPL incrementa los ácidos grasos libres en plasma de forma similar a la hormona de crecimiento, aunque la potencia de la HPL fué sólo alrededor del 0,1% del de la hormona de crecimiento.

La concentración de HPL en plasma de mujeres gestantes presenta un nivel máximo de 2-5 g./ml. al final - del embarazo (BECK y DAUGHADAY, 1967). Dado que la HPL - tiene una vida media de 20 minutos, la placenta puede producir de 2-3 g. de HPL diariamente. Tal enorme cantidad - de un péptido con propiedades lipolíticas puede explicar el incremento progresivo en plasma de ácidos grasos libres durante la gestación.

La HPL circula en el plasma materno y no puede ser detectado en sangre fetal; sin embargo se inducen cambios en el metabolismo fetal por la HPL, mediados por la madre.

Además de activar la lipólisis, la HPL tiene otros efectos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y de las proteínas. Inhibe la captura de glucosa por las células (TURTLE y KEPNIS, 1967) y la gluconeogénesis materna, economizando glucosa y proteínas (GRUMBACH, 1968). Por su acción insulinogénica, la HPL incrementa los niveles de insulina circulante, los cuales promueven la síntesis de proteínas y asegura así una fuente movilizable de aminoácidos maternos para transportar al feto.

Interpretando estas acciones metabólicas de la HPL, GRUMBACH postula que la HPL es la "hormona de crecimiento" de la última parte de la gestación que ejerce sus acciones metabólicas enteramente en la madre, para proveer energía al feto durante este período de rápido crecimiento.

Un papel biológico de la HPL puede ser, ciertamente, incrementar la secreción de insulina desde el páncreas e inducir cambios morfológicos en las células beta, similares a los visto durante la gestación (MALAISSI, 1969).

En tal situación endocrina, la actividad funcional de los islotes de LANGERHANS no puede dejar de verse afectada, y sería presumible que la gestación produjese un hiperinsulinismo secundario, y de hecho se observó que durante la gestación los islotes poseen una actividad basal más elevada (QUINTO y col., 1964). Investigaciones histológicas en humanos ponen de manifiesto la existencia de hiperplasia e hipertrofia de los islotes, con un aumento significativo de la insulina en el plasma. Utilizando métodos radioinmunológicos, muchos autores observaron que, después

de la administración de glucosa, el nivel de insulina se eleva más en mujeres gestantes que en normales (LIND y col., 1973; PICARD, 1967). De acuerdo con estos y otros autores (FREINKEL, 1964), se puede explicar este fenómeno como un "recambio" mucho más rápido de la insulina, relacionado con una degradación de la hormona por enzimas proteolíticas.

Finalmente, se considera que la HPL sola, respondería de muchos de los cambios metabólicos existentes durante la gestación; sin embargo está circulando junto - con concentraciones incrementadas de otras hormonas y, aunque es difícil determinar la contribución precisa de cada una de ellas, parece probable que sus acciones integradas continuas puedan estar implicadas en:

- la acción lipolítica del plasma de individuos gestantes,
- el incremento de los ácidos grasos libres del plasma,
- la resistencia a la insulina,
- la hiperinsulinemia e hiperplasia de los islotes pancreáticos

#### 1.9.1.2.- Alteraciones del sistema endocrino durante la gestación.

Como anteriormente se puso de manifiesto, (1.8.2) existe una gran cantidad de estudios referentes a la regulación hormonal del metabolismo lipídico, de los que se - puede establecer que, en un organismo normal, los efectos lipolíticos de STH, tiroxina, glucagón, cortisona, catecolaminas y estrógenos, son opuestos al efecto antilipolítico de la insulina; y es sabido que el sistema nervioso simpático ejerce una continua y extensa estimulación de los triglicéridos en el tejido adiposo.



Con estas referencias se han estudiado las alteraciones del sistema endocrino durante la gestación y se puede decir, en líneas generales, que junto a una clara hipersecreción de estrógenos, progesterona y un gonadotropismo crónico, existe durante la gestación un incremento de algunos de los factores endocrinos que tienen actividad lipolítica.

La mayoría de los autores admiten la existencia de una hipersecreción de STH (GEMZELL y col. 1955; LARON y col., 1967) y del tiroides (BARNES, 1965), así como un incremento significativo de cortisona (MARTIN y col., 1958; BRO-RASMUSSEN y col., 1962; FAIRWEATHER, 1971); sin embargo, análogamente a lo que ocurre después de un tratamiento con estrógenos ciertos investigadores mantienen que, durante la gestación, únicamente se incrementa el cortisol unido a la transcortina y por tanto no existe una verdadera hipersecreción de corticosteroides. Este problema no ha sido del todo resuelto todavía, debido a que la evaluación de la velocidad de secreción de la cortisona con métodos radioscópicos, y la determinación individual de cortisol en plasma, demostraron que la corteza adrenal segrega una gran cantidad de hidrocortisona y el cortisol libre alcanza niveles más elevados que en estado normal (DOLE y col. 1960; GAUTRAY, 1968; FAIRWEATHER, 1971).

Con respecto al comportamiento de la médula adrenal, los datos de la literatura son contradictorios. El nivel en plasma de las dos catecolaminas es normal para algunos autores (ISRAEL y col., 1959) y se eleva para otros (LEONE y col., 1958).

SPOTO (1962) hace un extenso examen de la lite-

ratura poniendo de manifiesto que no existen pruebas seguras del hecho de que a lo largo de la gestación se produzca una hiperactividad del sistema nervioso simpático. No obstante parece que la gestación modifica de diferentes formas el equilibrio neurovegetativo de varios órganos, por lo que no se puede excluir la posibilidad de un hipertono simpático que afecta al tejido adiposo.

Se puede concluir, por tanto, que, incluso sin considerar los factores intrínsecos de la célula adiposa, la lipólisis se puede explicar mediante las modificaciones del sistema endocrino, que tienen lugar durante la gestación.

#### 1.9.1.3.- Regulación de los niveles plasmáticos de ácidos grasos: el ciclo glucosa-ácidos grasos.

Todas las modificaciones metabólicas de la gestación se pueden explicar aceptando la teoría de RANDLE sobre la función del ciclo "glucosa-ácidos grasos". De acuerdo con esta teoría, basada en numerosos hechos clínicos y experimentales (RANDLE y col., 1965, 1966), el equilibrio entre estas dos sustancias fundamentalmente energéticas podría ser el resultado de un mecanismo de autorregulación mediante el cual, mientras que por un lado la utilización de glucosa inhibe la lipólisis y la oxidación de los ácidos grasos en el músculo, por otro la movilización y utilización periférica de los ácidos grasos libres, reduce el metabolismo de la glucosa a nivel de dicho órgano y, al menos en estados diabéticos, también a nivel de la célula adiposa.

El ciclo (Fig. nº10) explica cómo los niveles de

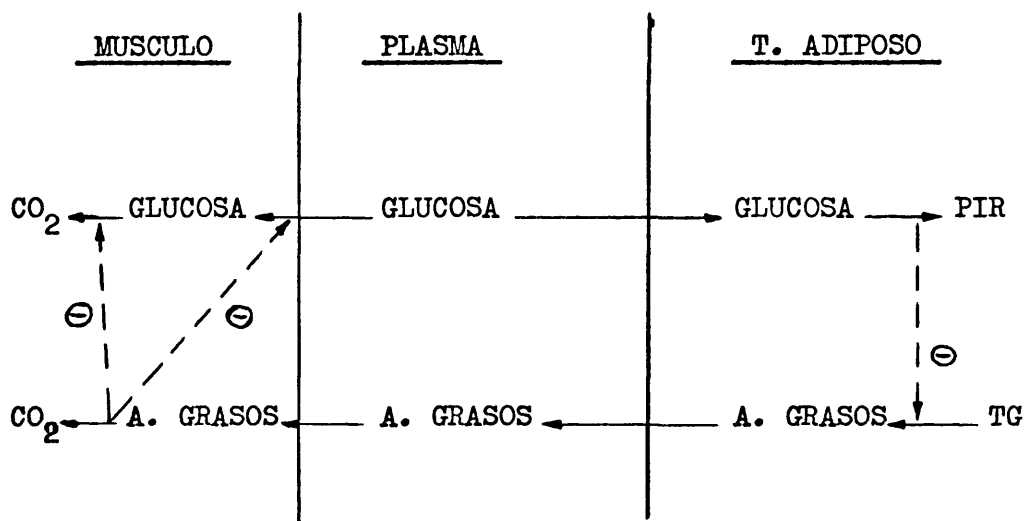


Figura 10. El ciclo glucosa/ácidos grasos (Newsholme y Start, 1973).

glucosa y de los ácidos grasos están relacionados de tal manera, que proporcionan al organismo uno de los mecanismos de control de la "homeostasia calórica" (FREDRICKSON y GORDON, 1958). Aunque dicho mecanismo no requiere necesariamente la intervención hormonal, es necesario admitir que en los animales superiores debe existir una regulación hormonal sobrepuesta. (Fig. nº 11).

En efecto, el aumento de los niveles de ácidos grasos plasmáticos disminuye el consumo de la glucosa y, en consecuencia, la glucemia aumenta. Este aumento de la glucemia estimula la liberación de insulina (CURRY y col., 1968) e inhibe la liberación de glucagón (IBERSON, 1971b). La liberación de insulina favorece el consumo de glucosa, la esterificación y, por consiguiente, la inhibición de la lipólisis. El aumento del consumo de glucosa conduce a la hipoglucemia, la cual estimula la liberación de glucagón (LUICK y col., 1970) e inhibe la de insulina (GRCDISKY y col., 1963). En consecuencia la lipólisis se estimula de nuevo y aumentan los niveles plasmáticos de ácidos grasos, lo que finalmente establece la glucemia.

Por consiguiente, la insulina reduce la lipólisis en el tejido adiposo y en el músculo, con aumento de la esterificación de los ácidos grasos, mientras que las hormonas antiinsulínicas actúan en el ciclo estimulando la lipólisis. De acuerdo con la teoría de RANDLE, el efecto inhibitorio de estas hormonas sobre la utilización periférica de glucosa no sería un fenómeno debido a una interferencia con los sistemas enzimáticos musculares, sino una simple consecuencia de sus propiedades "lipomovilizantes". Si se acepta esta teoría, las relaciones entre las modificaciones de los metabolismos de glucosa y lípidos, durante la gestación, deberán interpretarse de otra manera.

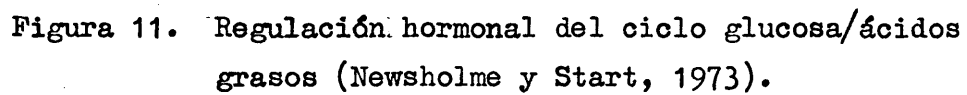


Figura 11. Regulación hormonal del ciclo glucosa/ácidos grasos (Newsholme y Start, 1973).

En efecto, los cambios en el metabolismo de la glucosa estarán subordinados a los del lipídico, como se pone de manifiesto por los siguientes hechos:

- Aumento de hormonas lipolíticas, incremento de la sensibilidad de las lipasas a las catecolaminas, aparición de un factor lipolítico placentario, incremento consecutivo de la movilización de ácidos grasos libres de los depósitos de grasa, con un aumento de la concentración de los mismos en plasma, que se interfiere con la utilización periférica de glucosa, determinando una resistencia a los efectos glicolíticos de la insulina que causa, por lo tanto, un hiperinsulinismo secundario.

#### 1.9.2.- Movilización de los lípidos durante la gestación.

Se ha observado en numerosas especies un alto contenido en grasa en el organismo del recién nacido, hecho especialmente notable en humanos y en cobayas (WIDDOWSON, 1950). El origen de estos lípidos no está claro. Los tejidos fetales, particularmente el hígado y tejido adiposo, tienen una lipogénesis muy activa y es probable que suplan la mayor parte de las necesidades fetales durante un gran período de la gestación (POPIAK, 1954; VILLE, 1958; VILLE, 1961; FAIN, 1966; TAYLOR, 1967; BALLARD, 1967; ROUX 1970; JONES, 1973; JONES, 1976 a; JONES Y FIRMIN, 1976).

Por otro lado, en la segunda mitad de la gestación incrementan los lípidos plasmáticos de la madre, (CURT 1960; MCKAY, 1963; SCOW, 1964; CTWAY, 1968; HERRERA, 1969; FAIRWEATHER, 1971; BOHMER, 1972), probablemente como resultado de su movilización desde el tejido adiposo (KNOPP y col., 1970; SCHONI y col., 1975). La permeabilidad de la placenta en muchas especies para los ácidos grasos (SZABO y GRIMALDI, 1970) sugiere que el incremento de los lípidos

plasmáticos de la madre, puedan estar asociados con un incremento en el aporte de los lípidos al feto, desde la circulación materna. Numerosos autores han intentado cuantificar esta contribución (FAIN y SCCW, 1966; HULL, 1975; ELPHICK y col., 1975) y ninguno ha aportado todavía resultados satisfactorios.

En el feto del cobaya, la acumulación lipídica hepática ocurre a la vez que declina la velocidad de biosíntesis de ácidos grasos y es posible que muchos de los lípidos almacenados sean de origen materno.

Para estudiar estas variaciones en el recambio lipídico en el tejido adiposo, hígado y plasma de la madre y feto, JONES (1976) utiliza cobayas en la última mitad de la gestación y observa que el incremento de la lipólisis en tejido adiposo de la madre, provocado por un incremento de hormonas lipolíticas circulantes, moviliza ácidos grasos, los cuales pasan al feto y son almacenados en el hígado como triglicéridos. El hígado del feto efectivamente separa ácidos grasos de larga y corta cadena desde la sangre de la vena umbilical. La cantidad de ácidos grasos transferidos desde la placenta es más que suficiente para justificar la acumulación de triglicéridos.

Después de numerosos estudios en humanos (CAVALLI, 1971; FAIRWEATHER, 1971; FABIAN y col., 1968; DANNENBURG y col., 1965), se puede concluir que durante la gestación se moviliza una gran cantidad de lípidos. El aumento de ácidos grasos no esterificados, glicéridos, - fosfolípidos y betalipoproteínas en plasma, apoya la hipótesis de la existencia de una hiperlipemia de transporte, inducida por un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo.

Esta interpretación también parece válida para explicar la hipercolesterolemia e hipercetonemia, ya que elevados niveles de ácidos grasos libres en plasma incrementan la oxidación periférica de los mismos y, por tanto, la formación de acetyl-CoA. Considerando que este metabolito es un precursor del colesterol y de los cuerpos cetónicos, y que su entrada en el ciclo de Krebs está reducida durante la gestación (debido a la baja utilización de glucosa), se comprende que elevados niveles de ácidos grasos libres conduzcan a la biosíntesis de ambos metabolitos.

Si bien estos fenómenos de hiperlipemia plasmática tienen lugar en la mayoría de las especies, ocurre exactamente lo contrario en el caso del conejo y del cobaya (POPJAK, 1946); ambas especies desarrollan una profunda hipolipemia, referente a casi todas las clases de lípidos plasmáticos, hacia el final de la gestación. Esta enorme disminución en el contenido de lípidos plasmáticos fué atribuída por BANMANN y HOLLY (1925-1926) a una utilización rápida de los lípidos maternos por el feto, durante el período de su máximo crecimiento; sin embargo el grado de hipolipemia es independiente del número de fetos que contiene la madre, por lo que la anterior hipótesis no resulta satisfactoria. Probablemente debe ser atribuída a determinadas influencias hormonales que se desarrollan durante la gestación (POPJAK, 1954).

En mono rhesus se presenta una hipolipemia, con un aumento de ácidos grasos y triglicéridos, sólo al final de la gestación (RCUX y col., 1974).



### 1.9.3.- Biosíntesis de lípidos.

El elevado nivel de lipólisis durante la gestación puede parecer contradictorio con el hecho de que normalmente se incrementan las reservas de grasa durante dicho estado, no solamente en casos de exceso de dieta, sino en casos de una dieta normal. Es necesario admitir entonces, que, durante la gestación, las células adiposas sintetizan ácidos grasos en mayor proporción que en estado normal.

Este fenómeno sólo puede ser explicado parcialmente por la hiperinsulinismo gestacional, ya que la insulina - ejerce, al mismo tiempo, efectos lipogénicos y antilipolíticos. El problema consiste entonces en clasificar los mecanismos a través de los cuales, en presencia de altos niveles de insulina, el tejido adiposo de una mujer gestante - incrementa su actividad lipogénica sin disminución de la lipólisis. Se sabe que las células adiposas utilizan la glucosa mediante la ruta de Embden-Meyerhof y la ruta de las pentosas; ambas vías metabólicas conducen a la formación de dos triosa-P: gliceraldehído-P y dihidroxiacetona. Existe entre ambas un equilibrio que depende de la triosa-P-isomerasa y de las velocidades de las reacciones siguientes a cada una de ellas. La contribución de ambas rutas en la utilización de glucosa se estudia incubando células adiposas con glucosa radiactiva marcada en las posiciones 1-6 respectivamente, habiéndose llegado a los siguientes resultados (MARTIN y col., 1965; KATZ y col., 1966):

- En el tejido adiposo de una mujer gestante predomina el ciclo de las pentosas sobre la ruta de Embden-Meyerhof.

- En sentido absoluto, el tejido adiposo sintetiza, a partir de ambos precursores, cantidades de ácidos grasos y glicerol superiores a los normales.

- La síntesis de ácidos grasos es relativamente superior a la de glicerol.

- Con respecto a las mujeres control, la cantidad de glucosa metabolizada por vía de las pentosas es mayor en las mujeres gestantes, si se calcula sobre la base de síntesis de glicerol.

- La conversión de gliceraldehído-P a dihidroxia cetona-P en las células adiposas es mucho menor que en estado normal.

Estos hechos ponen de manifiesto que existe un aumento de la lipogénesis durante la gestación; las células adiposas sintetizan más ácidos grasos y menos glicerol a partir de glucosa, explicando razonablemente bien el mecanismo mediante el cual el tejido adiposo de una mujer gestante puede, al mismo tiempo, incrementar sus actividades lipolíticas y lipogénicas. En efecto, si las cantidades mayores de glucosa que se utilizan por el tejido adiposo (bajo el estímulo de la insulina) se transforman en ácidos - grasos más que en glicerol, es lógico que junto a un incremento de la lipogénesis haya una falta relativa de glicero-P responsable de la síntesis de glicéridos, y el contenido de estos glicéridos de la célula adiposa podría explicar la hipersensibilidad de las lipasas a las catecolaminas.

El hígado juega un papel muy importante en el - metabolismo intermediario, experimentando una serie de al

teraciones durante la gestación (DANNEBURG y col., 1964).

- La lipogénesis hepática, a partir de acetato, es superior en estado gestante que en normal.

- Cuando se utiliza ácido pirúvico y glucosa como precursores, la actividad liposintética es igual en el estado normal que en el gestante.

- No hay diferencias cualitativas en la utilización hepática de glucosa, lo que se puede detectar comparando radioactividades incorporadas en glicerol y en ácidos grasos.

Estos resultados, si bien son ciertos para la mayoría de las especies estudiadas, resultan contradictorios cuando se estudia la lipogénesis, en tejidos aislados de conejo o cobaya gestantes (POPJAK, 1946; ROUX, 1966). El estudio de la utilización de acetato por cortes de hígado de conejas gestantes y no gestantes proporciona una explicación para la hipolipemia gestacional; los cortes del hígado de coneja gestante utilizaron mucho menos acetato que los no gestantes; la lipogénesis reprimida en el hígado es atribuible a alguna influencia hormonal. Así mismo POPJAK y BECKMANS (1950) encontraron que la velocidad de síntesis de colesterol es inferior en conejas gestantes.

#### 1.9.4.- Ácidos grasos del plasma, del tejido adiposo y del hígado.

Mediante análisis por cromatografía de gases, se ha puesto de manifiesto que, en plasma de mujeres gestantes, se produce, en las diferentes clases de lípidos, un aumento

progresivo en el porcentaje de ácidos grasos saturados - (sobre todo palmítico) y una correspondiente disminución de los poliinsaturados (sobre todo linoleico y araquidónico), excepto en los fosfolípidos, en los que se eleva el porcentaje de linoleico y el de araquidónico permanece invariable.

En cuanto al tejido adiposo no se observan variaciones significativas durante la gestación.

Respecto a las influencias hormonales, los estrógenos actúan sobre el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados, incrementando la esterificación, en fosfolípidos, del ácido araquidónico y favoreciendo la movilización de ácido linoleico de los depósitos. Los elevados niveles de estrógenos en plasma podrían explicar por qué en los fosfolípidos del plasma de mujeres gestantes no tiene lugar una disminución de los poliinsaturados. Considerando además las relaciones metabólicas entre los fosfolípidos y los ésteres de colesterol (el colesterol recibe una gran parte de sus ácidos grasos poliinsaturados de ciertos fosfolípidos mediante un proceso de transesterificación), la reducida concentración de ácido araquidónico en los ésteres de colesterol de mujer gestante depende de una insuficiencia en el proceso de transesterificación, relacionada con la hipercolesterolemia gestacional.

El incremento de ácidos grasos saturados y la disminución de los insaturados puede deberse a los siguientes hechos:

- A que el tejido adiposo contiene preferentemente ácidos grasos saturados; el aumento de la lipólisis produce un aumento de éstos en plasma.

- A la mayor utilización de ácidos grasos libres por los tejidos maternos, quienes oxidan, preferentemente, los insaturados.

- A la considerable absorción de ácidos poliinsaturados (sobre todo de los esenciales) por el feto y la placenta.

En ratas, desde hace tiempo, son conocidos algunos de los efectos de la gestación y de la lactancia sobre el metabolismo del hígado (CAMPBELL, 1949), pero los cambios en la composición lipídica producidos por ambos estados fisiológicos no están bien caracterizados. Algunos investigadores han puesto de manifiesto que la concentración de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos no cambia durante la gestación (DANNENBURG, 1964) y otros sugieren que hay cambios en la composición de los lípidos hepáticos durante la última parte de la gestación (MCKAY y col. 1963). SMITH y WALSH (1975) han estudiado recientemente este problema y observan que la concentración de triglicéridos se elevan al final de la gestación para decaer en la lactancia y elevarse de nuevo durante la involución de la glándula mamaria. El porcentaje de ácido oleico en los triglicéridos se incrementa en la lactación pero el linoleico decae. Sin embargo, la concentración de fosfolípidos no cambia, el porcentaje de palmítico en esta fracción experimenta un aumento, mientras decaen el estearico y el araquidónico tanto en la gestación como en la lactación.

MCKAY y KAUNITZ (1963) atribuyeron estos cambios en ratas gestantes a una movilización de los depósitos de grasa y a un aumento de la síntesis extramitocondrial de ácidos grasos en relación a las transformaciones mitocondriales a ácidos esteárico y araquidónico.

En cuanto al tejido adiposo, en ratas se ha visto que la gestación determina una disminución significativa - de ácido linoleico (BERGHER y col., 1964; MCKAY y col., 1963; DEGRELLE-CHEIMOL, 1970).

En conejas gestantes ACEBAL y col. (1973) observaron que la composición normal de ácidos grasos en lípidos totales de hígado sufría una modificación, siendo los cambios más destacados el incremento en la proporción relativa de ácidos palmítico y el descenso en las de esteárico y linoleico. Estos cambios son debidos a las variaciones - en la composición de ácidos grasos de triglicéridos y fosfolípidos; los triglicéridos son responsables de los cambios en las concentraciones relativas de los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico, mientras que la disminución de ácido linoleico se debe a los fosfolípidos.

SMITH y WALSH (1975), estudian en ovejitas que durante la gestación y principio de la lactación, hay un incremento significativo en las concentraciones de triglicéridos y ésteres de colesterol en los lípidos hepáticos, por otra parte pone de manifiesto que estos cambios están acompañados por altas concentraciones de ácido oleico y bajas de esteárico en ambas fracciones.

Como se deduce de lo expuesto anteriormente, tanto ACEBAL (1973) en sus trabajos con coneja gestante como

SMITH y WALSH (1975) en sus estudios con oveja gestante, ponen de manifiesto el descenso del ácido esteárico en la composición de ácidos grasos en los lípidos totales de hígado en animales gestantes; este hecho también se observó en el caso de la rata por estos mismos autores.

En lo que respecta al incremento del ácido oleico en los lípidos hepáticos, SMITH y WALSH (1975), como ya se indicó, lo han observado en rata y oveja gestante y lactante; este hecho parece estar relacionado con la producción de la grasa de la leche, puesto que NOBLE y col., (1970) pusieron de manifiesto que las concentraciones de ácido oléico en la grasa de la leche en oveja descendía desde un 45% aproximadamente de los ácidos grasos totales al principio de la lactancia hasta un 33% al final.

#### 1.9.5.- Lipoproteínas plasmáticas.

Durante la gestación han sido puestos de manifiesto cambios estructurales en las lipoproteínas plasmáticas por análisis de lípidos circulantes y técnicas de electroforesis y ultracentrifugación. Estos cambios están asociados a un incremento en la concentración total de  $\beta$ -lipoproteína y pre- $\beta$ -lipoproteína en plasma (SONG y col., 1969; STUDNITZ, W. VON, 1955).

La literatura presenta resultados conflictivos acerca de los cambios en la composición lipoproteica durante la gestación (HILLMAN y col., 1975; WARTH y col. 1973). Esto condujo a WILLIAMS (1976) a examinar el problema, encontrando una relación constante entre el colesterol plasmático y la apolipoproteína-B (apo-B, es la principal apolipoproteína de las lipoproteínas de baja densidad) en su

jetos normales y en aquellos que presentan trastornos del metabolismo de lipoproteínas (BAUTOVICH y col. 1975). Observó en humanos que durante la gestación hay un progresivo - descenso en la porción de colesterol para apo-B en plasma; el valor vuelve a ser normal al cabo de 6 semanas.

Estudios realizados por ACEBAL y col. (1973) en conejas gestantes, ponen de manifiesto que los niveles de colesterol total en suero sufren un notable descenso durante la gestación, a la vez que la distribución de lipoproteínas en suero muestra un desplazamiento significativo hacia un incremento relativo de las pre- $\beta$ -lipoproteínas, junto - con un incremento en la liberación de triglicéridos por el hígado.

Parece ser que estos cambios de composición observados en las lipoproteínas durante la gestación son de origen hormonal, pero no son producidos por estrógenos en su totalidad, ni por progesterona, ni por la hormona de crecimiento. Los estrógenos y los andrógenos afectan a la composición de las lipoproteínas y es posible que tengan - efectos antagónicos (FURMAN y col. 1967; FURMAN y col. 1968). Los estrógenos provocan un aumento de triglicéridos de VLDL y LDL y de fosfolípidos de VLDL, pero no de colesterol de VLDL (FURMAN y col., 1968).

La gestación origina un ascenso en apo- $\beta$  de LDL y VLDL, pero hay un descenso en la proporción de colesterol de VLDL y LDL comparado con el estado no-gestante. HILLMAN (1975) ha observado cambios parecidos en VLDL y LDL.

La hormona de crecimiento, como ya se indicó an-



teriormente, es química-física y biológicamente similar al lactógeno de la placenta humana (CATT, K.J. y col., 1967; FRIESEN, H. 1965; JOSIMOVICH y col. 1963) la cual, como es sabido, aumenta en la gestación (KALKHOFF y col. 1964; WILLIAMS y col. 1972). Muchos de los cambios observados en este estado fisiológico pueden estar producidos por la hormona de crecimiento o por sustancias análogas. Además, el lactógeno placentario humano tiene una vida media corta. Su rápido transporte desde la sangre puede explicar el cambio de lipoproteínas plasmáticas hacia los niveles normales en pocos días. También se ha demostrado que son antagónicos a la insulina (KALKHOFF y col. 1964; TURTLE y col. 1972). Sin embargo la hiperlipemia no ocurrió en pacientes acromegálicos ni en pacientes con carcinoma, en los cuales se encuentra elevado el nivel de lactógeno placentario.

Por último, se considera que estas alteraciones de las lipoproteínas plasmáticas en la gestación pueden ser importantes para el feto y para las necesidades energéticas de la madre. Tanto el ácido linoleico como el colesterol son nutrientes esenciales del feto y se ha comprobado que atraviesan la placenta (CONNER, 1967; WARTH, 1973). Es posible que el descenso progresivo de colesterol/apo- $\beta$  y el aumento de triglicéridos /apo- $\beta$ , determinen fisiológicamente la eficacia de estos y otros nutrientes esenciales para la placenta y el desarrollo fetal.

Lo que todavía no se ha puesto de manifiesto es si en el embarazo humano la hiperlipemia es el resultado de un aumento de la producción de lipoproteínas o de un catabolismo defectivo.

#### 1.9.6.- Algunos aspectos sobre las relaciones hormonales materno fetales.

La importancia del estudio de las posibles relaciones que existen entre la madre y el feto, desde el punto de vista hormonal, radica en el hecho de que determinados desórdenes endocrinos de la madre pueden producir al feto daños irreversibles.

Además de las hormonas que producen la madre y el feto, la placenta es el principal elemento de este sistema; no solamente regula el intercambio de sustancias entre las circulaciones materna y fetal, sino que es el sitio principal en la producción de hormonas (gonadotropina coriónica, lactógeno placentario, estrógenos).

Con respecto a la insulina, parece existir acuerdo en que el feto sintetiza su propia hormona, poseyendo autonomía respecto a su producción y eliminación, ya desde las etapas previas de la vida intrauterina (ALEXANDER y col. 1968 (a); BASSET, 1971); sin embargo, no todos los autores están de acuerdo en lo que se refiere a los mecanismos de secreción en respuesta a conocidos estimulantes como la glucosa; no obstante parece ser que la madurez del feto a este respecto se desarrolla en la última fase de la gestación, y, en algunos casos, después del nacimiento (WILLES y col. 1968; ALEXANDER y col. 1968 (b)). En cualquier caso, la placenta es impermeable a la insulina (SPELLACY y col. 1964; ADAM y col. 1968), al menos en hombre y en oveja, como se demuestra en la independencia de las concentraciones materna y fetal y por la ausencia de una transferencia neta en preparaciones de placenta perfundida.

La placenta no produce hormona tiroidea alguna ni forma parte de este sistema endocrino, excepto para regular el paso de tiroxina de la madre al feto. La hormona estimulante del tiroides (TSH) aparentemente no atraviesa la placenta y la actividad del tiroides fetal depende de la elaboración de TSH por la hipofisis del feto (PETERSON y col. 1952). El usual efecto de retroinhibición, homeostático, de la tiroxina en la producción de TSH también prevalece en el feto. El tiroides fetal, en resumen, desarrolla capacidad para la completa producción de hormonas tiroides desde el principio de la gestación; ésto incluye: captura del yoduro, transformación a iodo, iodación de la tirosina y producción de triyodo-tironina y tiroxina. Ambas atraviesan la placenta, si bien el paso es lento para la última.

En contraste con el tiroides, la glándula adrenal fetal es anatómicamente diferente de la del adulto y produce un conjunto de hormonas cuantitativamente diferente. Hay evidencia, tanto por estudios "in vivo" como "in vitro", de que la glándula adrenal fetal produce cortisol, el glucocorticoide fisiológico (LAWMAN, 1961; MURPHY y col, 1974). En la primera parte de la gestación humana, la mayor parte del cortisol atraviesa la placenta, transformándose en el feto en cortisona. Parece probable que la mayor parte de la cortisona materna del suero derive de la unidad feto-placentaria. En la oveja, sin embargo, la placenta supone una clara barrera en el movimiento materno-fetal de cortisol; pero en ambas especies, los niveles del cortisol se elevan pocos días antes del parto y se supone que sea uno de los factores que inician el comienzo del mismo. Más evidencia de la independencia que existe entre el cortisol del feto y el de la madre son los elevados niveles del teji

do adrenal y la diferencia de niveles en la circulación umbilical en el feto humano hacia la mitad del desarrollo. Por otra parte, la ACTH materna no atraviesa la barrera placentaria y el desarrollo y función de la corteza adrenal del feto depende de la estimulación por la ACTH procedente de la hipófisis fetal.

En rata la actividad adrenocorticotrópica se inicia entre los días 17 y 18 del desarrollo intrauterino (MILKOVIC y col. 1973); los corticoides maternos pasan a través de la placenta y elevan los niveles de corticosterona fetal; como consecuencia de esto se bloquea la actividad adrenocorticotrópica de la hipófisis fetal. Cuando comienza la actividad adrenocorticotrópica fetal en el día 17 del desarrollo intrauterino, el exceso de corticosterona materna disminuirá, y su carencia estimulará la actividad adrenocorticotrópica fetal, por un mecanismo feed-back que opera en el desarrollo fetal, como han puesto de manifiesto MILKOVIC y col., (1970).

El cortisol se liga a proteínas del suero, la más importante de las cuales es una globulina específica (transcortina). Como en el caso de la tiroxina, la capacidad del suero materno para transportar cortisol se incrementa durante la gestación y es mayor que en el feto (SANDBERG y col., 1965); esto puede favorecer elevadas concentraciones de cortisol en sangre materna y limitar su transferencia por vía placentaria.

Comparado con la función adrenal y la del tiroides, el metabolismo de las hormonas sexuales durante la -

gestación es más complejo. En este sentido, además del control de su distribución entre la madre y el feto, la placenta es muy activa en la producción de estas hormonas. Parece existir una interdependencia entre placenta y feto, ya que cada uno le proporciona al otro precursores para la síntesis de esteroides. Hormonas similares, producidas por uno de ellos pueden ser metabolizadas por el otro. Las tres clases de hormonas sexuales, progestágenos, estrógenos y andrógenos, están también relacionadas en su síntesis y conversión. Estas relaciones completas se están comprendiendo más cada día pero, en contra de lo que pudiera parecer, se conoce muy poco de la contribución que las hormonas sexuales tienen en el mantenimiento de la normalidad materna y fetal. (BENGTSSON y col. 1964; KLEVIT 1960; AARSKOG 1964; PEARLMAN y col. 1967).

## PROYECTO DE TRABAJO

Se ha realizado un estudio de lipogénesis hepática en ratas gestantes y controles mediante la técnica de hígado perfundido.

En la última década ha resurgido la técnica de hígado perfundido. Esto ha ocurrido, en parte, porque se ha puesto de manifiesto que cortes de tejidos y preparaciones de componentes subcelulares no ofrecen modelos adecuados para el estudio de la regulación de vías metabólicas completas (KREBS, 1968); por ejemplo, la gluconeogénesis (ROSS, 1967), la cetogénesis (KREBS, 1969) y la síntesis de ácidos grasos son mucho más bajas en cortes de tejidos (CHERMICK, 1950) y en extractos de células libres, que la observada "in vivo" (LOWENSTEIN, 1971) o en hígado perfundido de rata (BRUNENGRABER, 1973). Por otra parte, los resultados "in vivo" del metabolismo hepático son influenciados por procesos que ocurren en otros órganos. El hígado perfundido es pues el instrumento ideal para el estudio de su propia regulación metabólica.

Los diversos métodos de perfusión hepática usados en la actualidad difieren poco en esencia. El empleado en este trabajo (HEMS, 1966) ofrece muchas ventajas: utilizar un medio de perfusión con hematies humanos procedentes de sangre extraída y conservada asepticamente y el empleo de un sistema de perfusión sencillo, con piezas fácilmente lavables y reemplazables. El medio de perfusión compuesto por hematies, albúmina en baja concentración y solución salina con todos los requerimientos minerales de los tejidos de los animales superiores, tiene baja viscosidad, lo que permite obtener un flujo rápido a través del hígado con la consiguiente oxigenación del tejido; por último, el aislamiento "in situ" del hígado, acorta sensiblemente el tiempo de anoxia que necesariamente debe sufrir la célula hepática en condiciones experimentales.

El objeto del presente trabajo es el estudio de la biosíntesis de las distintas fracciones lipídicas hepáticas en animales gestantes (20º días) y no gestantes, utilizando como precursor ( $1-^{14}\text{C}$ )-acetato. Las fracciones estudiadas son: fosfolípidos, diglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos y ésteres de colesterol, tanto en el medio de perfusión a lo largo de la experiencia, como en el hígado al final de la misma. Por último, se realiza un análisis de los ácidos grasos en lípidos tisulares hepáticos.

Se utilizan ratas de la especie *Rattus norvegicus* de raza Wistar, mantenidas en nuestro laboratorio bajo las mismas condiciones estándar.

Iniciada la perfusión, se dejan transcurrir 40 minutos de estabilización antes de añadir el precursor; una vez puesto, se recogen muestras del medio de perfusión a los 5, 10, 15, 20 y 50 minutos; en algunos casos se tomaron únicamente a los 5 y 50 minutos. Al cabo de este tiempo se finaliza la experiencia, procediéndose inmediatamente a realizar las determinaciones analíticas.

Hemos considerado interesante utilizar esta metodología para el estudio de la biosíntesis lipídica hepática, en la rata gestante, con el fin de ver cómo responde el hígado por sí sólo, fuera de toda influencia hormonal a la que ha estado sometido el animal durante ese estado fisiológico y estudiar de qué manera viene condicionado su comportamiento metabólico en el 20º día de gestación.

Finalmente se realizaran experiencias "in vivo" mediante inyección intravenosa de ( $1-^{14}\text{C}$ )acetato a los dos grupos de animales, gestantes y no gestantes, estudiándose la incorporación de dicho sustrato a los lípidos totales hepáticos y su distribución en las fracciones lipídicas mayoritarias.

## II.- MATERIAL Y METODOS.



## 2.- MATERIAL Y METODOS.

### 2.1.- MATERIAL

#### 2.1.1.- Medios Instrumentales.

Las pesadas se realizaron en una balanza Sauter, tipo 404/11.

Para la determinación del ph se utilizó un peachfímetro Beckman, Expandomatic, SS-2.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga M.S.E.

Las medidas colorimétricas se realizaron en un colorímetro spectromic de BAUSCH y LOMB.

La albúmina para el medio de perfusión, fué dializada en tubos Wisking 36 por 32.

La bomba peristáltica utilizada en la perfusión hepática, procede de la Watson-Marlow's modelo MARE-200 (Falmouth Cornwall, Inglaterra).

Las determinaciones radiométricas fueron realizadas en un contador de centelleo líquido, marca Intertecnic tipo 5L30 PR.

#### 2.1.2.- Productos.

(1-14 C) Acetato sódico: Este compuesto fué servido por Nuclear Ibérica. La procedencia es el Radiochemical Centre de Amersham (Inglaterra). Dicho producto se presenta liofilizado en ampolla de vidrio. Sus características son las siguientes: peso mo

lecular 84 y actividad específica 60 m Ci/m mol.

La albúmina sérico bovina, fracción V, procede de Armour Pharmacentrical Co., (Eastbourne, Inglaterra).

Todos los productos utilizados y descritos en los apartados (2.4) y (2.5) son de la casa Merck.

## 2.2.- ANIMALES EN EXPERIMENTACION.

En el presente trabajo se utilizaron ratas hembras de la especie *Rattus norvegicus* (var.albina) raza Wistar.

Empleamos lotes de animales controles (no gestantes) y lotes de animales en avanzado estado de gestación (20 días).

Todos los animales dispusieron de comida y agua "ad libitum", hasta 12-14 horas antes de la experiencia, en que se les retiró el alimento para homologar las condiciones experimentales.

## 2.3.- DETERMINACION DEL DIA O DE GESTACION.

La técnica empleada es la siguiente: se ponen, en la misma jaula, dos hembras con un macho, se les deja toda una noche retirando el macho a la mañana siguiente.

Para comprobar si hubo cópula, se realizaron frotis vaginales, extrayendo con una pipeta Pasteur una suspensión de células de la vagina en agua destilada; dicha suspensión fué colocada en un portaobjetos y examinada al microscopio.

Sabido es que la cópula sólo ocurre durante la fase de estro, dentro del ciclo estral de la rata, por lo que el frotis vaginal cumple dos funciones. La primera, de-

terminar si hay o no espermatozoides, lo que nos indica que la cópula ha tenido lugar en ese día, y entonces las probabilidades de que la rata quede preñada son grandes. La segunda, conocer la etapa del ciclo en que se encuentran - las ratas que no poseen espermatozoides en la vagina, lo que nos dará idea de en qué momento llegarán al estro y estarán por tanto, en fase receptiva.

Si existen espermatozoides en la vagina, consideramos ese día como el día 0 de gestación y a partir de él empezamos a contar los 21 días que han de transcurrir hasta el momento del parto.

Así se puede conocer con toda seguridad el día - de gestación del animal en el momento de efectuar la experiencia.

Para mayor certeza, se efectuaron dos controles: 1) ratas gestantes que se suponen quedaron preñadas el mismo día que las utilizados en el experimento, se dejaron - llegar hasta el parto. 2) se comprobó tamaño y peso de los fetos en cada una de las experiencias.

#### 2.4.- PERFUSION HEPATICA.

El método de perfusión hepática ha sido descrito por Hems y col., (1966).

##### 2.4.1.- Medio de perfusión.

El medio de perfusión está compuesto por hemati- tes humanos lavados, albúmina bovina fracción V y solución salina Krebs-Henseleit con un Ph final de 7.4. El medio - es constantemente gaseado con una mezcla compuesta de 95% de oxígeno y 5% de carbónico.

#### 2.4.2.- Solución salina.

La solución salina utilizada es la denominada Krebs-Hensenleit y ha sido preparada de la siguiente forma:

Se adicionan 125 ml. de  $\text{CO}_2$  HNa al 1,3% a 750 ml. de "mezcla salina". La mezcla resultante se gasea durante 10 minutos en gas carbógeno (95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$ ) y se utiliza inmediatamente.

La mezcla salina se prepara de la siguiente manera:

200 ml. de solución acuosa de cloruro sódico al 18%  
160 ml. de solución acuosa de cloruro potásico al 1,15%  
120 ml. de solución acuosa de cloruro cálcico, 0,11 M  
120 ml. de solución acuosa de bicarbonato potásico al 1,3%  
40 ml. de solución acuosa de sulfato magnésico al 3,82%  
31 ml. de solución acuosa de fosfato monopotásico, 0,2 M  
3.800 ml. de agua destilada.

#### 2.4.3.- Albúmina.

Se prepara una solución de albúmina bovina fracción V al 10% y se dializa en solución salina Krebs-Hensenleit durante 48 horas en tubos Wisking 36/32.

#### 2.4.4.- Lavado de hematíes.

100 ml. de sangre total se centrifugan a 2000 r.p.m. durante 10 minutos y se extrae el plasma y la primera capa de elementos formes. Los hematíes resultantes se mezclan con tres veces su volumen de solución salina y el sobrenadante se separa por centrifugación a 2000 r.p.m. durante 5 minutos. Esta última operación se repite dos ve-

ces más y el residuo, constituido casi exclusivamente por hematíes, se diluye con 1/4 aproximadamente de su volumen de solución salina y se procede a la medida de la hemoglobina.

#### 2.4.5.- Técnica para la medida de la hemoglobina.

Se siguió el método de EVELYN y MALLOY que se basa en la transformación de la hemoglobina en cianometahemoglobina mediante la adición de ferrocianuro de potasio y cianuro de sodio. La densidad del color producido es directamente proporcional a la cantidad de hemoglobina presente.

#### 2.4.6.- Preparación del medio de perfusión.

De acuerdo con la concentración de hemoglobina del concentrado de hematíes, la albúmina y la solución salina se mezclan como indica la tabla siguiente:

% Hemoglobina	Hematíes ml.	Albúmina (10%) ml.	Solución salina ml.
9	42	39	69
10	38	39	73
11	34	39	77
12	31	39	80
13	29	39	82
14	27	39	84
15	25	39	86
16	24	39	87
17	22	39	89
18	21	39	90
19	20	39	91
20	19	39	92

El volumen final es de 150 ml. quedando la albúmina a una concentración de 2,6% (P/V) y la de hemoglobina al 2,5%(P/V)

#### 2.4.7.- Aparato de perfusión.

El aparato de perfusión, basado en las ideas de MILLER y col., (1951) y de SCHIMASSEK (1963) ha sido descrito por HEMS y colaboradores (1966).

El sistema, que permite la perfusión de dos hígados simultáneamente, está situado en una cabina termostatizada a  $35^{\circ}\text{C}$ , de dimensiones 160 x 60 cm. Bajo la cabina se hallan situados dos agitadores magnéticos para la continua agitación del medio de perfusión en los vasos - colectores.

El esquema de la figura que se muestra a continuación, (Fig. 1) permite conocer con detalle uno de los circuitos existentes en el interior de la cabina.

El oxigenador, construido en vidrio, ofrece una gran superficie al medio de perfusión que, al extenderse en su interior, permite a los hematíes tomar contacto con el gas. La parte inferior del oxigenador sirve de reservorio del medio de perfusión, el cual es mantenido en un nivel constante gracias a un tubo acodado que drena al - vaso colector el exceso de líquido. Aproximadamente a la misma altura de este último tubo penetra el gas, previamente lavado por burbujeo a través de agua destilada, que procede de una bala situada en el exterior de la cabina. Una tercera tubuladura lateral permite adaptar un termó-metro para el control de la temperatura del medio ( $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

La boca ancha del vaso colector ajusta perfectamente con un saliente circular adosado a la parte in-

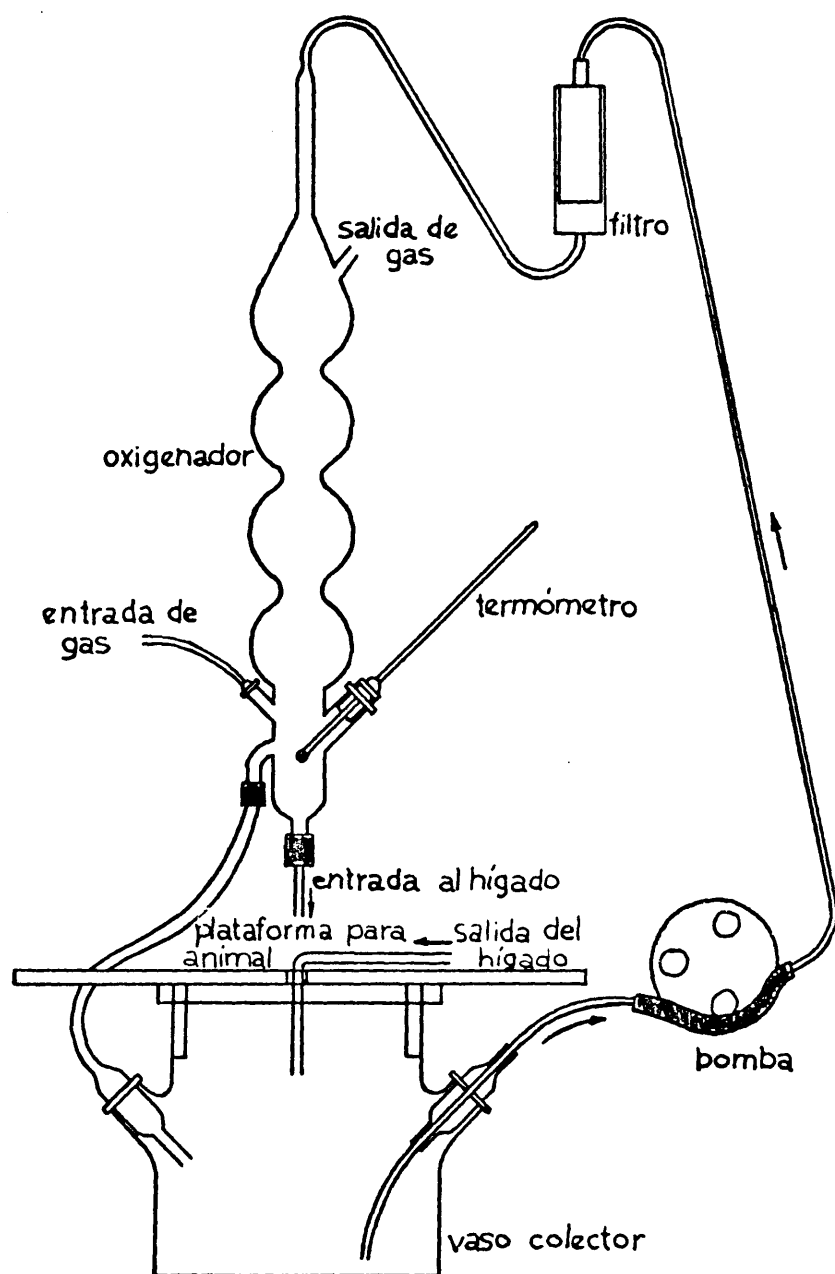


Figura 1. APARATO DE PERFUSION

ferior de la plataforma portadora del animal. Dicho vaso tiene, así mismo, tres tubuladuras laterales, una que recibe el exceso de medio del oxigenador, otra que ajusta con el tubo extractor y una tercera (no visible en la figura) que permite la toma de muestras y las adiciones al medio de perfusión.

Una bomba de tipo peristáltico (H.R. Flow Inducer. Watson- Marlow Ltd, Marlow) eleva el medio de perfusión desde el vaso colector hasta el extremo superior del oxigenador, pasando a través de un filtro de los usados - habitualmente en transfusión humana.

Los componentes del circuito están conectados entre sí por tubo de vinilo permeable a los gases, a excepción del tubo que conduce el exceso de medio del oxigenador al vaso colector (NT 18) y las conexiones (en oscuro en la figura), que son de tubo siliconado de gran flexibilidad (5,0 x 1,6 mm).

El flujo de entrada al hígado del medio de perfusión es controlado, si es necesario, por medio de una pinza instalada en el tubo que transporte el medio desde el extremo inferior del oxigenador al hígado del animal. En estas condiciones, y con la pinza abierta, la presión hidrostática viene dada por la altura comprendida entre la superficie del medio de perfusión en el reservorio del oxigenador y el hígado del animal, altura que varía entre 12 y 15 cm. El medio que procede del hígado es transportado por un tubo de vinilo (NT/6) que penetra en el vaso - colector.



#### 2.4.8.- Operación quirúrgica.

Se utilizan ratas hembras de raza Wistar cuyo peso oscila entre los 200 y los 250 g. que son anestesiadas por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a dosis de 0,15 ml. de solución al 6% por cada 100 g. de peso del animal.

La rata así anestesiada, se fija mediante cinta adhesiva a la placa portadora del animal y se le inyectan en vena safena 0,1 ml. de heparina (Heparina LEO, 1% Eq. a 100 U.I.).

Se abre el abdomen por incisión longitudinal en la línea media y transversales a derecha e izquierda. Los principales vasos de la pared abdominal se cierran por - cuatro pequeñas pinzas hemostáticas y el paquete intestinal se desplaza a la izquierda del animal. A continuación se coloca una ligadura floja en la vena cava por encima de la renal derecha. Dos ligaduras, que fijarán luego la cánula, se colocan alrededor de la vena porta a una distancia aproximada de 2mm. de la bifurcación de ésta hacia los lóbulos hepáticos, y otra ligadura se coloca en la misma vena lejos del hígado, con objeto de impedir la circulación más allá del lugar de inserción de la cánula. Se canula ahora la vena porta con una cánula Frankis - Evans nº 16 G, se atan las ligaduras mediante un nudo doble y se - extrae el fiador del interior de la cánula. (figura 2).

Seguidamente se abre el tórax mediante dos incisiones transversales, bordeando el diafragma, que se continúan longitudinalmente a uno y otro lado de la caja torácica. Se seccionan los nervios vago y frénico, así como el esófago, y se coloca una ligadura floja alrededor de la

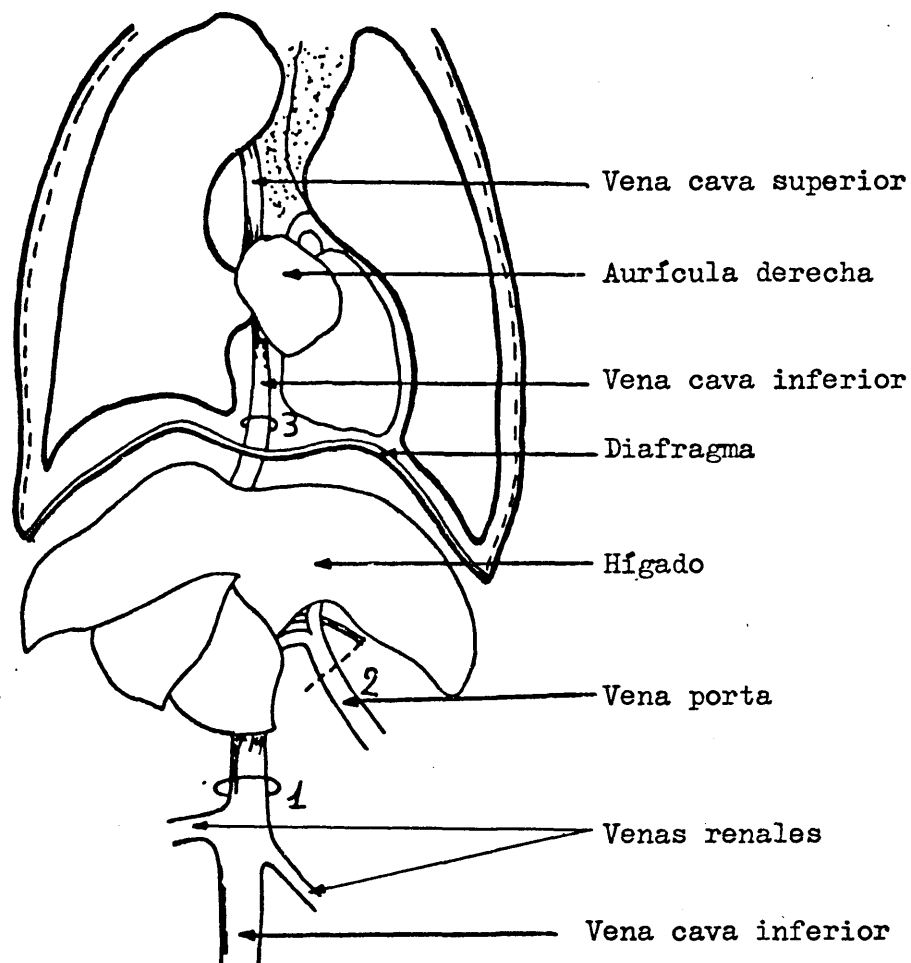


Figura 2. Disposición de las ligaduras en la preparación para perfundir el hígado de rata.

(1) En vena cava inferior por encima de la renal derecha. (2) ligadura de fijación de la cánula en vena porta. (3) Ligadura de fijación de la cánula en vena cava inferior.

cava inferior en las proximidades del corazón. En estas - condiciones se canula la vena cava inferior a través de la aurícula derecha; para ello se utiliza una cánula de plástico (Portex PP 270) de unos 5 cm. de longitud, leve nente alargada a la llama y cortada en "pico de flauta". La cánula se sujeta mediante un doble nudo practicado en la ligadura colocada anteriormente.

Finalmente se cierra la ligadura preparada alrededor de la cava inferior por encima de la renal.

Aislado de esta manera el hígado del animal, se conecta inmediatamente al circuito de perfusión. El tiempo transcurrido entre la canulación de la vena porta y la conexión del hígado al circuito no debe ser superior a los 4 minutos. La velocidad de flujo del medio de perfusión a través del hígado oscila entre 10 y 15 ml/min.

Dos hígados son perfundidos simultaneamente, - sirviendo uno como control.

#### 2.4.9.- Planificación experimental.

Conectado el hígado al circuito de perfusión se le deja un tiempo de estabilización de 40 minutos (HEMS 1966). El sustrato <sup>14</sup>C-acetato es añadido en el minuto 38 y el intervalo 38-40 minutos es suficiente para que se mezcle uniformemente en el volumen total de perfusión; a partir de este momento se realiza la recogida de muestras a los 5, 10, 15, 20 y 50 minutos en que finaliza la experiencia, procediéndose inmediatamente a homogeneizar el hígado y realizar las determinaciones analíticas.

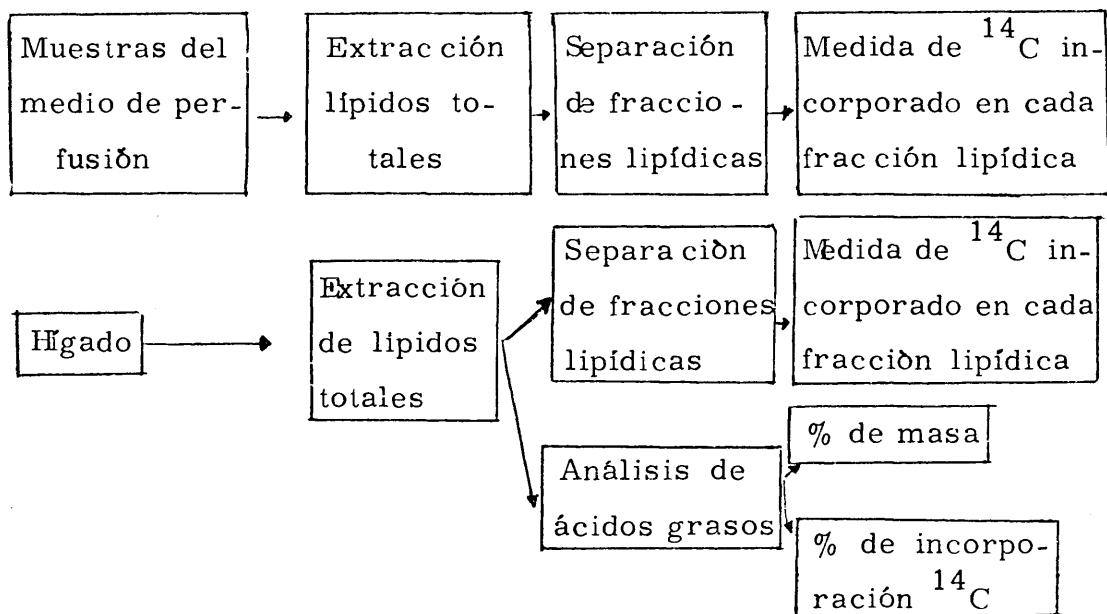
La toma de muestras del líquido de perfusión en cada tiempo se hace por partida doble:

- Una, del medio de perfusión que se encuentra en el vaso colector y que la bomba impulsa para llevarlo al hígado (muestras que denominaremos de entrada (E)).

- Y otra, del medio de perfusión a la salida del hígado (muestras que denominaremos de salida (S)).

El volumen de las muestras se fijó en 5 ml. para poder cuantificar con eficacia la cantidad de lípidos totales circulantes. El hígado no sufre alteración ni modificación alguna con retirar los 50 ml. que supone el total de muestras.

El proceso seguido en el experimento se ajusta al esquema que se presenta a continuación:



## 2.5.- DETERMINACIONES ANALITICAS.

### 2.5.1.- Aislamiento de los lípidos totales.

El procedimiento seguido para la extracción de los lípidos totales está basado en el método de BLIGH y DYER (1959) y la purificación en el método de FOLCH y col. (1957). (Véase el esquema de la Fig. 3 ).

El extracto lipídico se llevó a sequedad, hasta peso constante, en evaporador a presión reducida (15-20 mm Hg), manteniendo la temperatura a 37°C.

La eliminación del agua residual se favoreció disolviendo la muestra en hexano o en metanol anhidros.

Los lípidos, concentrados y pesados, se almacenaron bajo atmósfera de nitrógeno, para evitar posibles oxidaciones, a -20°C hasta el momento de su utilización.

### 2.5.2.- Separación cromatográfica de los lípidos totales.

#### 2.5.2.1.- Preparación y aplicación de muestras.

Los lípidos totales, llevados a sequedad, se han disuelto en cloroformo/metanol (2:1V/V) a concentración conocida de 1 mg/10  $\mu$ l para los lípidos hepáticos y 0,1 mg/0.1 ml. para los lípidos totales procedentes del medio de perfusión.

Para la separación de las diferentes fracciones lipídicas se han empleado técnicas de cromatografía en ca

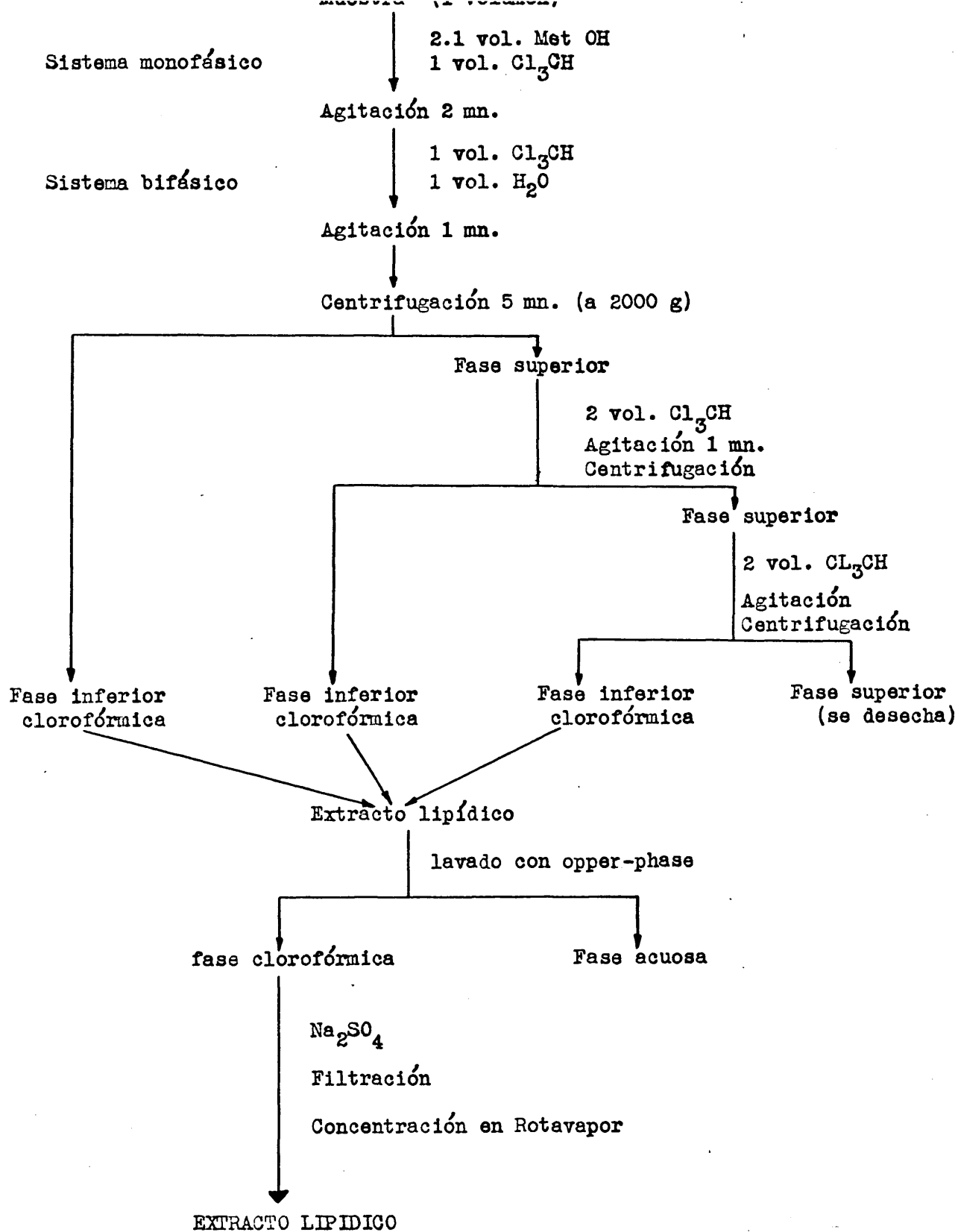


Figura 12.- Esquema de la extracción de lípidos.

pa fina. Se han utilizado placas de vidrio cuyo adsorbente era silicagel G (Kiessigel 60 F-254- Merck) con un espesor de 0,25 mm. Las aplicaciones en el cromatograma se realizan en banda de 3 cm. y la cantidad de lípidos totales cromatografiados es de 1 mg para los lípidos hepáticos y 0,5 mg. para los lípidos circulantes.

El sistema empleado para el desarrollo de las cromatografías fué: n-Hexano/eter/acético (70: 30: 1, V/V/V).

#### 2.5.2.2.- Técnicas de revelado.

Una vez desarrolladas las cromatografías, se dejan las placas a temperatura ambiente con el fin de que se evapore todo resto de disolvente; los lípidos se visualizan introduciendo las placas cromatografiadas en una cubeta saturada de vapores de Iodo (MANGOLD y col., 1961; SIMS y col. 1962). En poco tiempo el iodo se absorbe selectivamente sobre las regiones donde han quedado situadas las diferentes clases de lípidos, originándose manchas amarillas perfectamente visibles sobre el fondo blanco de la placa. Después de enmarcar con un punzón cada banda, se sublima el iodo, dejando la placa al aire, o bien calentando ligeramente en estufa, Seguidamente se procede al raspado de las manchas, recogiénolas en viales para medir su actividad en el contador de centelleo.(Fig. 4).

##### 2.5.2.2.1.- Colesterol y ésteres de colesterol.

La identificación de las fracciones de colesterol y ésteres de colesterol se realizó, además del proce

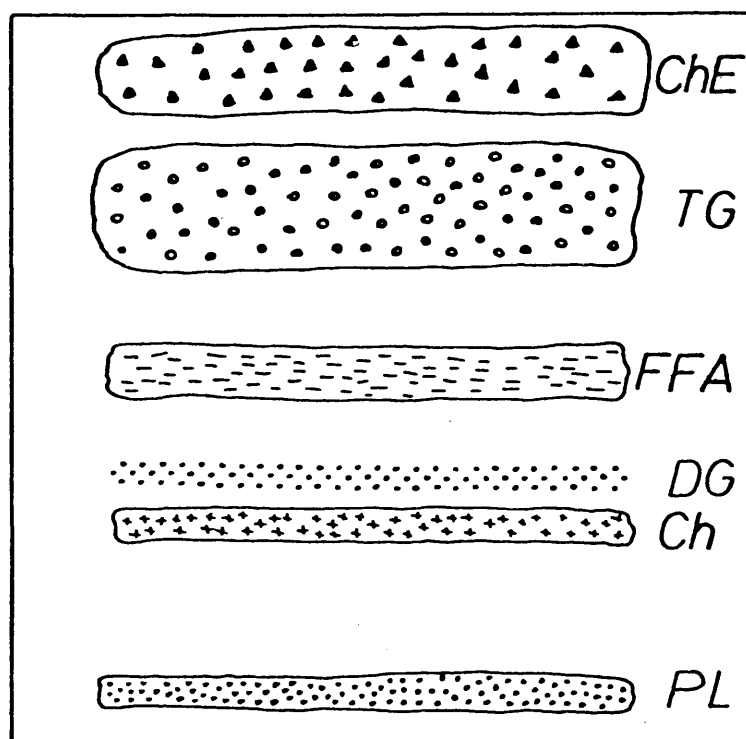


Figura 4. Disposición de las diferentes fracciones lipídicas en el cromatograma.

PL: fosfolípidos.

Ch: colesterol.

DG: diglicéridos.

FFA: ácidos grasos libres.

TG: triglicéridos.

ChE: ésteres de colesterol.



dimiento explicado anteriormente, con un revelador específico para ambos, a fin de evitar posibles confusiones. Las áreas de localización del colesterol y de los diglicéridos están muy próximos y pueden cometerse errores a la hora de delimitar las manchas correspondientes a cada uno; por esta razón se utilizaron los dos revelados, además de emplear colesterol patrón en todas las cromatografías.

El revelador específico para el colesterol consta de:

- 90 ml. de solución de  $\text{Cl}_3\text{F} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 0,5%.
- 5 ml. de ácido acético glacial.
- 5 ml. de ácidos sulfúrico concentrado.

Una vez desarrollada la cromatografía y evaporado el resto del disolvente que queda en la placa, se pulveriza con dicho revelador y se introduce la placa en estufa a  $100^\circ\text{C}$  durante unos minutos. Las áreas correspondientes quedan visibles mediante una coloración morada.

#### 2.5.2.3.- Medida de la radiactividad.

Para la media de radiactividad contenida en las muestras utilizamos un espectrómetro de centelleo líquido, marca Intertecnikue, tipo 5L30 PR. Esta unidad incluye un cambiador automático de muestras con capacidad para 200 viales. El aparato trabajó a temperatura autocontrolada. Los viales portamuestras son de vidrio especial con tapón de rosca de gran hermeticidad y volumen aproximado de 20 ml. La solución centelleadora empleada ha sido el Instagel, fabricado por la Packard Instrument Company.

Los valores obtenidos son corregidos para el quenching y eficiencia de conteo.

### 2.5.3.- Análisis de ácidos grasos.

El análisis de ácidos grasos se realizó en los lípidos totales del tejido hepático, hallándose por un lado el % de masa y por otro el % de incorporación de  $^{14}\text{C}$ -acetato.

#### 2.5.3.1.- Cromatografía en fase de vapor.

##### 2.5.3.1.1.- Preparación de las muestras.

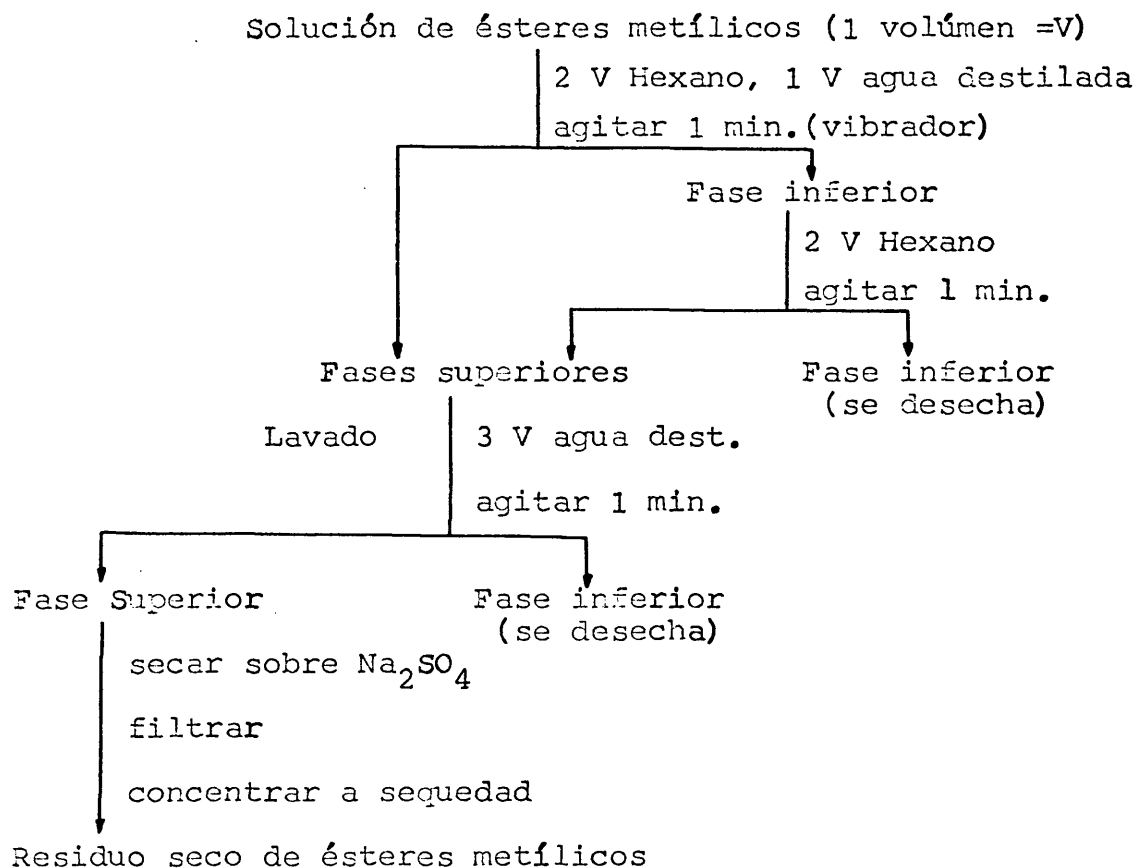
Los extractos de lípidos totales, se metanolizaron según el método de METCALFE y col., (1966).

Se parte de 10 mg. de lípidos totales y se colocan en tubos de vidrio de paredes gruesas (20 x 150 mm) a los que se agregan:

Metanol reactivo (Carlo Erba) .....	1,0 ml.
Trifluoruro de B oro 14% en MeOH (p/p) .....	1,0 ml.
Benceno .....	0,9 ml.

Los tubos se cierran con soplete, bajo atmósfera de nitrógeno, y se mantienen a  $110^{\circ}\text{C}$  durante 90 minutos.

Transcurrido este tiempo los tubos se enfrían a temperatura ambiente y se abren para proceder a la extracción de los ésteres metílicos de la mezcla de reacción - según el siguiente esquema:



#### 2.5.3.1.2.- Análisis de los ésteres metílicos.

El residuo seco de ésteres metílicos se recoge con un pequeño volumen de hexano y se inyecta en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, mod. 5750, equipado con un detector de ionización de llama y columnas de acero inoxidable de 2 m. de longitud y 0,25 mm. de diámetro interno, rellenas con polisuccinato de etilenglicol (fase estacionaria) al 20% sobre Cromosorb W/AW, (80-100 mallas). Las áreas de los picos se determinan con un integrador-impresor Hewlett-Packard, modelo 3370 A. Se operó a 170°C, siendo las temperaturas del detector e inyector de 25°C y 300°C, respectivamente.

La identidad de los picos y la validez cuanti

tativa de las concentraciones calculadas para los ácidos grasos se establecen por comparación con patrones de ésteres metílicos de los diferentes ácidos grasos.

La detección de la actividad incorporada en ácidos grasos se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer F20FE con un detector de radiactividad Berthold LB 2503.

### III.- RESULTADOS Y DISCUSION.

### 3.1.- EXPERIENCIAS EN HIGADO PERFUNDIDO.

#### 3.1.1.- PERFUSION DE HIGADO CON $10\mu\text{Ci}$ DE $(1-^{14}\text{C})\text{ACETATO}$ .

##### 3.1.1.1.- Ratas control.

En este tipo de experiencias se han llevado a cabo determinaciones de:

- peso de hígado.
- lípidos totales hepáticos
- lípidos totales circulantes
- incorporación de  $(1-^{14}\text{C})\text{acetato}$  a lípidos hepáticos y a lípidos circulantes así como su distribución en las diferentes fracciones lipídicas (fosfolípidos, diglicéridos, colesterol, - ácidos grasos libres, triglicéridos y ésteres de colesterol).

El peso de hígado de los diferentes animales varía entre - límites comprendidos entre 7,0 y 11,7g (tabla 1), y por consiguiente los valores de lípidos totales hepáticos presenta una variación que queda reflejada en la relación de lípidos totales/g de tejido entre límites de 28,03 y 42,85 mg/g. Sinclair (1974) en estudios de lipogénesis durante el desarrollo de la rata, aporta el dato de 44,1 mg de lípidos totales por gramo de tejido hepático para ratas adultas con un peso medio de hígado de 14,9g.

Los lípidos circulantes en el medio de perfusión (tabla 2) van aumentando en función del tiempo, llegando en algunos casos a alcanzar un valor casi doble del inicial; hemos observado valores iniciales de 0,9 frente a 1,7 mg/5ml

Peso rata	Peso hígado	Lípidos totales	Líp.totales/Peso hígado
g.	g.	mg.	mg./g.
260	11,7	328	28,03
210	8,3	275	33,13
232	10,0	293	29,30
219	10,4	294	28,27
240	7,2	239	33,06
271	10,2	269	25,61
264	11,3	327	28,90
260	8,3	300	36,10
235	7,7	200	25,97
200	7,0	232	33,14
230	7,3	305	41,48
220	8,4	360	42,85
$\bar{M}: 236,75 \pm 22.84$	$8,98 \pm 1.65$	$285,16 \pm 45.24$	$32,15 \pm 5.64$

Tabla nº 1.- Ratas hembras controles. Perfusión del hígado con  $10\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -Acetato. Peso de los animales, peso del hígado, lípidos totales del hígado y contenido lipídico por g. de tejido hepático.

Tiempo min.	Muestra	Animal						
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
5	E	0,9	1,9	1,2	1,1	0,9	1,5	1,0
	S	1,1	2,1	2,0	1,0	1,1	1,9	1,0
10	E	-	-	-	-	1,0	1,5	1,3
	S	-	-	-	-	1,1	1,0	1,3
15	E	-	-	-	-	1,1	1,5	1,1
	S	-	-	-	-	1,3	1,0	1,1
20	E	-	-	-	-	1,4	1,7	1,0
	S	-	-	-	-	1,0	1,3	1,3
50	E	1,7	1,7	1,3	1,6	1,7	2,0	1,4
	S	1,8	2,0	2,1	1,8	1,8	2,4	1,4

Tabla n° 2.- Ratas hembras controles,mg. de lípidos totales/5 ml. de medio de perfusión en los diferentes tiempos durante la experiencia. E = entradas (muestra recogida del vaso colector) S = salidas (muestra recogida a la salida del hígado).



de medio de perfusión al final de la experiencia. No se apre cian diferentes notables entre los resultados (figura 1) ob tenidos en muestras de medio de perfusión tomadas del vaso colector (Entradas (E)) y de la salida del hígado (Salidas (S)).

Los  $10\mu\text{Ci}$  de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato añadidos al medio de perfusión (0,17 moles), suponen una concentración de 0,066  $\mu\text{Ci/ml}$ .

La incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato a los lípidos totales hepáticos representa un 5% aproximadamente y un 0,5% para los lípidos circulantes al final del periodo experimental (50 minutos).

Los valores de incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato alcanzados en este grupo de experiencias, se ejemplifican en los datos que se reúnen en las representaciones de la figura 2. En dicha figura aparecen los valores de radiactividad de las fracciones lipídicas circulantes (fig. 1a, 1b y 1c) a lo largo de la experiencia y mediante diagrama de barras - (fig. 1d) el de las fracciones lipídicas hepáticas examinadas al final de la misma.

Las fracciones lipídicas que mostraron actividad significativa fueron las de fosfolípidos, colesterol, ácidos grasos libres y triglicéridos; todas manifiestan un incremen to en función del tiempo de experimentación, siendo muy nota ble para la fracción de triglicéridos cuyo valor inicial al final de la experiencia queda aumentado aproximadamente 100 veces.

Nuestros resultados están de acuerdo con los obte nidos por Soler Arcilaga (1974) en sus estudios de lipogéne sis en hígado perfundido en rata, encontrando que al final - del período experimental (60 minutos en el trabajo citado),

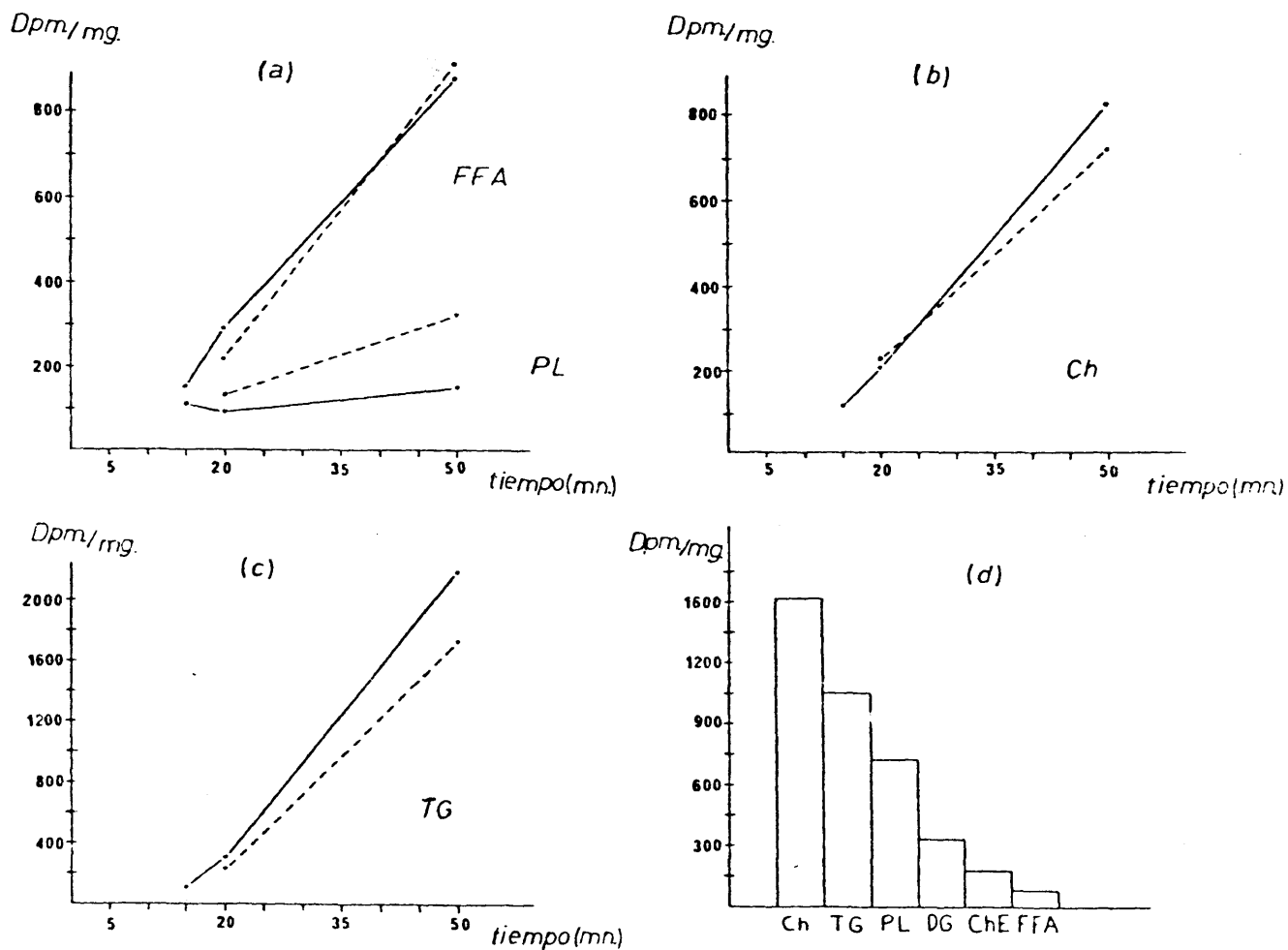


Figura 1.- Ratas control. Perfusión con 10uCi de (1-<sup>14</sup>C)acetato. Valores de radiac-  
 tividad de las fracciones lipídicas circulantes (a, b y c) durante el  
 tiempo de perfusión. El diagrama de barras (d) representa los valores  
 de las fracciones lipídicas hepáticas examinadas al final del mismo.  
 Los valores vienen expresados en Dpm/mg de lípidos totales.

E= ————— ; S = - - - - -

la fracción plasmática que presenta mayor actividad es la de colesterol seguida por la de triglicéridos y la de fosfolípidos. Igualmente, para los ésteres de colesterol coincidimos con el citado autor en que esta fracción no presenta trazas significativas de radiactividad; pensamos que este hecho puede ser debido a que, dado que la esterificación del colesterol tiene lugar fundamentalmente en el plasma por la acción de la enzima LCTA (lecitín-colesterol-acil-transferasa), los niveles de dicha enzima en el medio de perfusión no son lo suficientemente altos para que este proceso sea perceptible.

Que el hígado segrega al plasma la enzima LCTA, - ha sido puesto de manifiesto por OSUGA y col. (1971) realizando experiencias "in vivo" así como SIMON y col. (1971) - realizando experiencias con hígado perfundido de rata. En estudios recientes HAMILTON y col. (1976) trabajando con hígado perfundido, muestran que la esterificación del colesterol en el medio de perfusión, aumenta en función del tiempo de perfusión presentando valores de 0,5 g/ml de medio a las 2 horas, para alcanzar 2,5 g/ml al cabo de 6 horas. Es lógico pensar que en nuestras experiencias, la síntesis de ésteres de colesterol a partir del (1-<sup>14</sup>C) acetato añadido y durante los 50 minutos de período experimental sea insignificante.

En lo que respecta a fracciones tisulares hepáticas, es el colesterol el que presenta una mayor actividad, resultados similar al obtenido por SCLER ARCILAGA, seguido por triglicéridos, fosfolípidos, diglicéridos, ésteres de - colesterol y ácidos grasos libres.

### 3.1.1.2.- Ratas gestantes.

En este grupo de experiencias se han llevado a cabo las mismas determinaciones que las consignadas anteriormente (3.1.1.1) para el grupo de ratas control.

Comparando los resultados obtenidos en ratas gestantes del peso de hígados, lípidos totales hepáticos y relación mg de lípidos totales/g de tejido se pone de manifiesto que, si bien los valores medios para este grupo son superiores a los de las ratas controles (tabla 3), no son estadísticamente significativos; el valor medio en gestantes de la relación mg/g de tejido hepático es de 37,20 frente a 32,15 - representado en la fig. 3.

Los lípidos circulantes en el medio de perfusión (tabla 4), a los 5 minutos de añadir el acetato son ligeramente superiores en las ratas gestantes que en las controles; estos valores alcanzados en gestantes, no experimentan variaciones significativas a lo largo de la experiencia (figura 2, a diferencia de lo que ocurre en los animales control en que es manifiesta la elevación progresiva de estos valores. Por otro lado, tampoco ha sido posible detectar variaciones significativas entre las muestras denominadas de entrada (E) y las de salida (S).

Los  $10\mu\text{Ci}$  de ( $1-^{14}\text{C}$ ) acetato añadidos al medio de perfusión (0,17  $\mu\text{moles}$ ) suponen una concentración de 0,066  $\mu\text{Ci/ml}$ .

El ( $1-^{14}\text{C}$ ) acetato incorporado en los lípidos hepáticos al cabo de los 50 minutos, representa el 2,2% de la cantidad administrada, valor que se reduce aproximadamente un 50% del obtenido en las ratas control (Fig. 4), para los lípidos totales circulantes representa el 0,26%.

Peso rata g.	Peso hígado g.	Lípidos totales mg.	Líp.totales/Peso hígado mg./g.
390	14,5	501	34,55
400	11,5	435	37,82
341	12,6	418	33,19
304	10,3	388	37,82
331	11,3	486	42,90
303	10,0	367	36,96
<hr/>			
$\bar{M}: 344,83 \pm 41.80$	$11,7 \pm 1.65$	$432,50 \pm 52.99$	$37,20 \pm 3.36$

Tabla n° 3.- Ratas gestantes. Relación de los pesos de los animales, de los hígados, de las cantidades de lípidos totales y la razón mg. de lípidos por g. de tejido hepático.

Tiempo min.	Muestra	Animal				
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
5	E	2,2	1,2	2,0	1,7	2,0
	S	2,0	1,7	1,6	1,6	1,6
50	E	1,9	1,6	1,8	1,8	1,9
	S	1,2	1,5	1,7	2,0	2,1

Tabla n° 4.- Ratas gestantes. mg. de lípidos totales/5 ml. de medio de perfusión en los diferentes tiempos durante la experiencia. E = entradas; S = salidas.

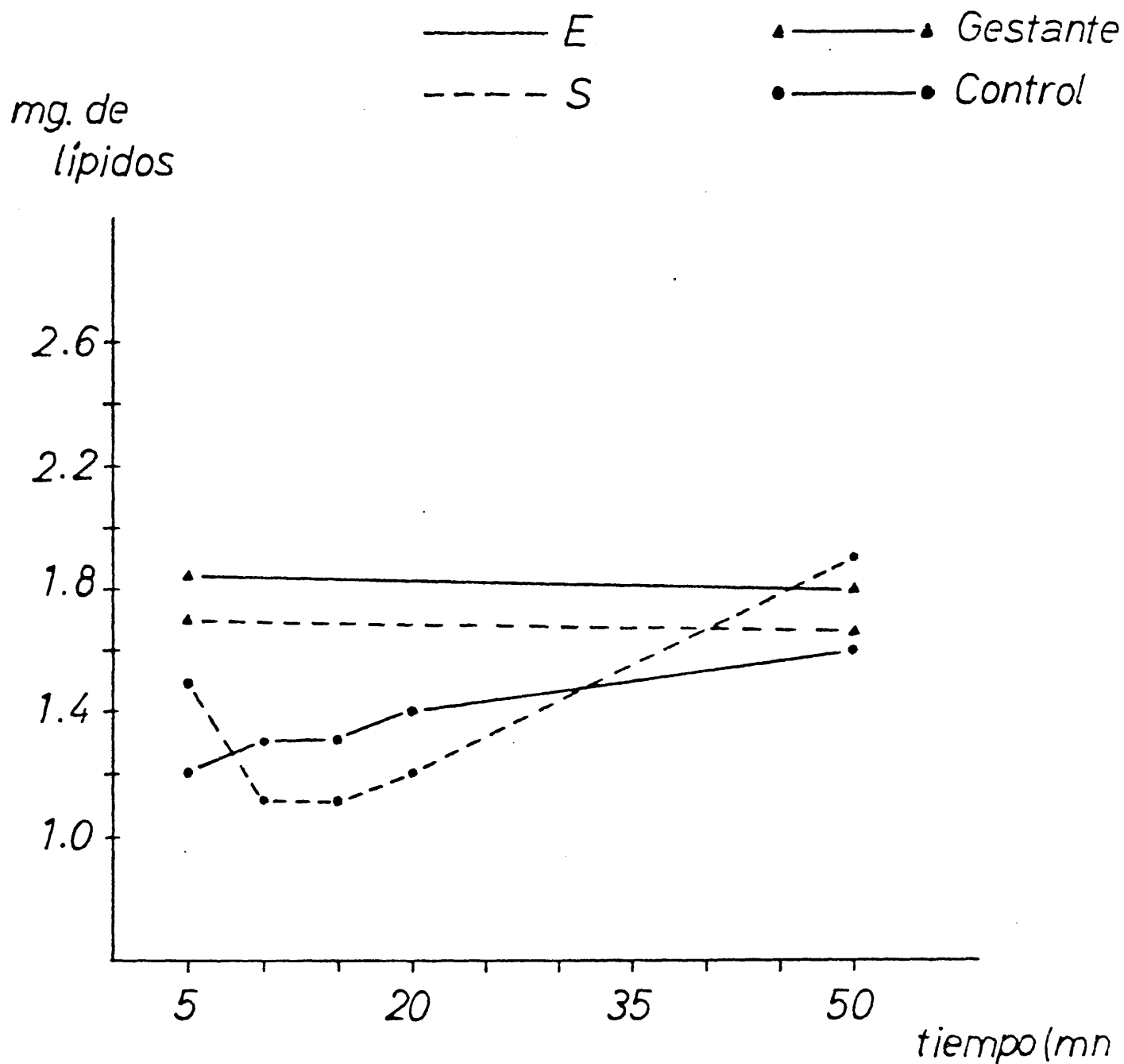


Figura 2.- Lípidos totales circulantes durante el tiempo de perfusión en ratas controles y gestantes. Los valores vienen expresados en mg de lípidos totales/5 ml de medio de perfusión (per\_fusión con 10uCi de (1-<sup>14</sup>C)acetato).

mg. lípidos/g. hígado

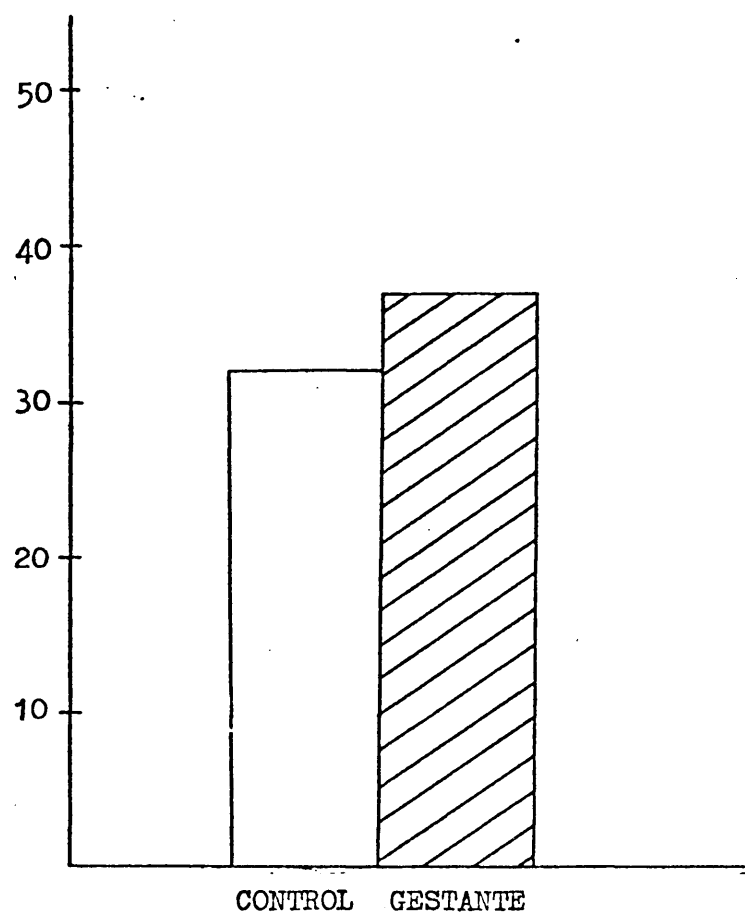


Figura 3.- Representa el valor de la relación mg. de lípidos totales/g. de hígado en ratas controles y gestantes.

La mencionada característica que exhiben los animales gestantes, en cuanto mantienen una cierta constancia - en los niveles lipídicos totales circulantes frente a los niveles crecientes mostrados por las ratas control, se pone, - asimismo, de manifiesto en la confrontación de la incorporación isotópica por las más importantes clases de lípidos, llevada a cabo en ambas situaciones fisiológicas.

En los animales control, las fracciones de ácidos grasos libres, fosfolípidos y triglicéridos, ven aumentada - su incorporación isotópica total a lo largo de la experiencia. Indudablemente, el ( $1-^{14}\text{C}$ ) acetato, como consecuencia de su - activación inicial y consiguiente utilización de la acetil-CoA por el complejo enzimático de ácido graso sintetasa, originará en un principio ácidos grasos libres, con el consiguiente aumento de la radiactividad total de esa fracción lipídica.

Esta, progresivamente, mayor incorporación isotópica en los ácidos grasos libres circulantes de las experiencias control, ocasiona el natural aumento en la radiactividad de las fracciones lipídicas que, con mayor eficiencia, se biosintetizan a partir de los ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos. Merece destacarse, sin embargo, la diferencia en cuanto a la incorporación en ambas clases de lípidos, los triglicéridos se biosintetizan en hígado control más activamente que lo hacen los fosfolípidos. Por otro lado, en los animales control se puede apreciar otra tendencia diferencial entre ambas clases de lípidos; los triglicéridos circulantes que entran en el hígado exhiben mayor incorporación isotópica que los correspondientes lípidos cuando salen del órgano, señal evidente de su utilización en el mantenimiento energético y metabólico del sistema; por el contrario, está asimismo clara la - tendencia opuesta que muestran los fosfolípidos al ser utilizados los precursores isotópicos para su síntesis hepática - de manera que salen del órgano niveles más elevados de incorporación que los que corresponden a la entrada, señal de su liberación, posiblemente, ante la no necesidad de su empleo en la creación de estructuras que los sistemas "in vivo" puedan requerir.



Mención aparte merece, por su especial situación metabólica, la biosíntesis hepática del colesterol libre, - que experimenta un notable aumento durante las experiencias control de perfusión sin que pueda evidenciarse diferencia en cuanto a las muestras tomadas previamente y después de su paso a través del hígado.

Frente a este conjunto de características metabólicas del hígado control perfundido, hay que hacer notar, - pues, las diferencias particulares que las distintas clases de lípidos examinadas ofrecen en la perfusión del hígado gestante, (tablas 5 y 6). En la figura 5 (a, b y c) aparecen, respectivamente, las diferencias encontradas en la incorporación isotópica total en ácidos grasos libres, fosfolípidos y triglicéridos. Hay que hacer notar, en principio, un hecho - que aparece en dichas figuras, en donde se representan los - resultados de diferentes experiencias de perfusión y es notable su variabilidad cuantitativa, si bien, se conservan las características generales cualitativas; hecho, por otro lado, nada extraño si se tiene en cuenta cómo a la variabilidad individual normal se añaden las circunstancias fisiológicas, metabólicas y reguladoras que la gestación supone, - llenas de variables de imposible fijación, y que obliga, tanto a una restricción en la interpretación cuantitativa de - los datos experimentales, como a la preferente consideración de las tendencias cualitativas de los hechos observados.

Es así, pues, que las tres clases de lípidos, ácidos grasos libres, fosfolípidos, y triglicéridos, presentan en el transcurso de la perfusión de ratas gestantes, niveles de incorporación isotópica de gran constancia. La incorporación de (1- $^{14}\text{C}$ ) acetato en ácidos grasos libres alcanza, en - los primeros minutos, los niveles que se mantendrán prácticamente sin variación a lo largo de la experiencia; a su vez,

Fracciones	Tiempo min.		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
FOSFOLIPIDOS	5	E	5.268		808	6.134	-
		S	3.124	-	930	6.248	-
	50	E	4.086	644	448	2.006	584
		S	6.270	578	396	3.780	586
AC. GRASOS LIBRES	5	E	902	-	158	256	-
		S	654	-	198	404	-
	50	E	1.194	210	192	200	216
		S	920	212	164	400	296
TRIGLICERIDOS	5	E	826	-	-	-	-
		S	550	-	-	-	-
	50	E	794	200	-	-	626
		S	670	1.412	-	-	358

Tabla n° 5.- Ratas gestantes. Incorporación de 10 $\mu$ Ci de  $^{14}$ C-Acetato en las fracciones lipídicas correspondientes a los lípidos circulantes. Los valores vienen expresados en Dpm/1 mg. de lípidos totales.

Animal	HIGADO					
	PL	DG	Ch	FFA	TG	ChE
(1)	270	201	111	224	152	105
(2)	205	710	261	105	381	-
(3)	210	101	-	-	176	-
(4)	290	150	-	100	107	-
(5)	204	-	157	-	384	-

Tabla n° 6.- Ratas gestantes. Incorporación de 10 $\mu$ Ci de  $^{14}$ C-acetato en las fracciones lipídicas correspondientes a los lípidos totales hepáticos. Los valores vienen expresados en Dpm/ 1 mg. de lípidos totales.

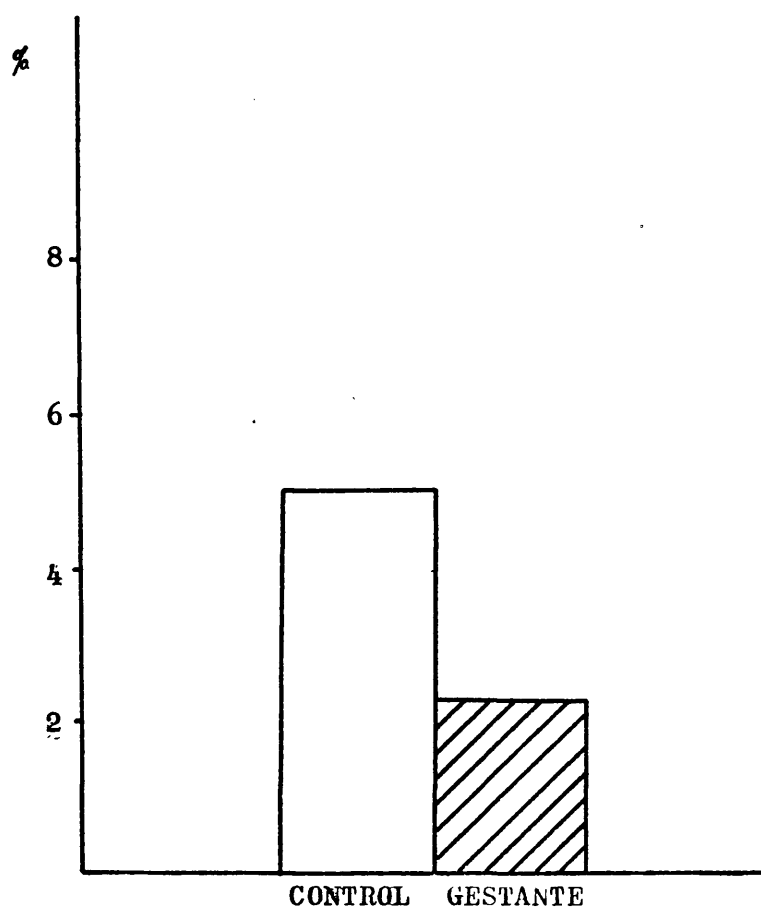


Figura 4.- Representa el % de  $^{14}\text{C}$ -acetato utilizado por el hígado perfundido durante 50 minutos con  $10\mu\text{Ci}$  de  $(1-^{14}\text{C})$ -acetato, en ratas controles y gestantes.

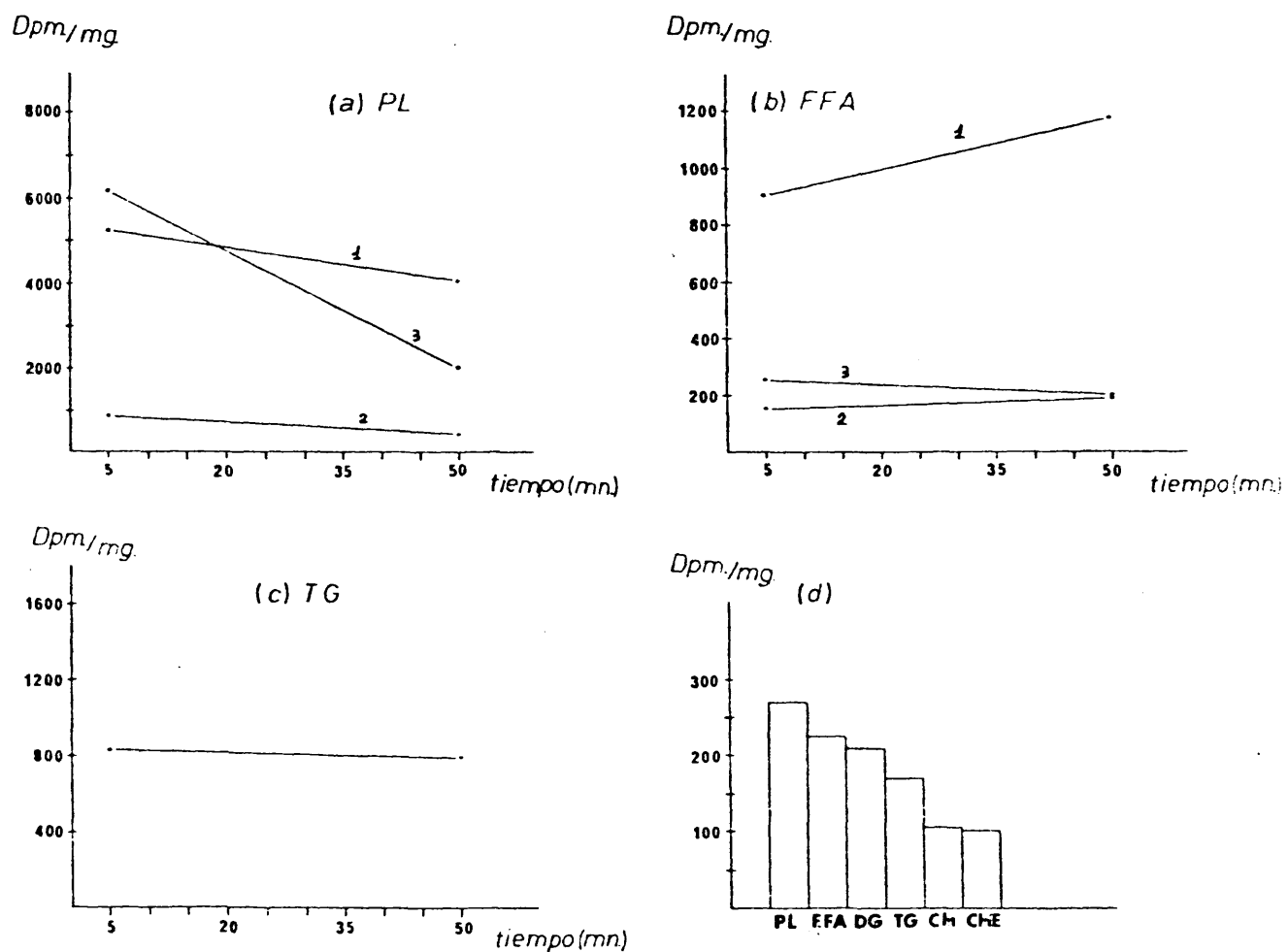


Figura 5.- Ratas gestantes. Perfusión con  $10\mu\text{Ci}$  de  $(1-^{14}\text{C})$ acetado. Valores de radioactividad de las fracciones lipídicas circulantes (a, b y c), durante el tiempo de perfusión. El diagrama de barras (d) representa los valores de las fracciones lipídicas hepáticas examinadas al final del mismo. Los valores vienen expresados en Dpm/mg de lípidos totales.

(1,2,3) = diferentes animales.

———— = Muestras de Entrada (E)

la incorporación de los ácidos grasos en las clases de lípidos origina rápidamente los niveles isotópicos casi invariables a lo largo del proceso. Otra característica significativa es la gran incorporación isotópica que ofrecen los fosfolípidos en comparación con la de las incorporaciones en ácidos grasos libres y en triglicéricos; en los animales gestantes, dicha incorporación en fosfolípidos es notablemente superior a la presentada por los animales controles. Ante la doble posibilidad que justifique esta elevación, parece que el aumento de la cantidad relativa de fosfolípidos sea la interpretación más razonable.

Esta interpretación está de acuerdo con los datos que, para los lípidos hepáticos, aparecen en las figuras 1d y 5d, según los cuales, el valor de la relación PL/TG en los animales gestantes y controles, es, respectivamente, 1,6 y 0,6. Abundando en esta interpretación, se encuentra también el mayor nivel de incorporación que presentan los ácidos grasos libres en los hígados gestantes. (PL/FFA = 1,2) frente a los controles (PL/FFA = 7,0); datos encontrados en el tejido hepático que, a su vez, tienen su correspondencia con los resultados de los ácidos grasos libres en el sistema de perfusión (figs. 1a y 5a).

### 3.1.2.- PERFUSION DE HIGADO CON 1mCi DE (1-<sup>14</sup>C)ACETATO

La utilización de 10 $\mu$ Ci de (1-<sup>14</sup>C)acetato en las experiencias anteriores y la cantidad absoluta de acetato empleado sirvieron de puesta a punto metodológica y para la obtención comparada de datos de incorporación en las clases de lípidos mayoritarias. La conveniencia de llevar a cabo una confrontación de los resultados anteriores con los obtenidos en condiciones de mayor incorporación isotópica en más clases de lípidos y en mayor número de muestras a lo largo de la perfusión, motivó el diseño de una segunda serie de experiencias según las condiciones siguientes: después de los 40 minutos de estabilización del hígado perfundido, se añaden al medio de perfusión una cantidad de sustrato 100 veces superior a la que veníamos utilizando, es decir, 1mCi de (1-<sup>14</sup>C)acetato (17 $\mu$ moles) equivalente a 6,6 $\mu$ Ci/ml.

#### 3.1.2.1.- Ratas control.

En este grupo de experiencias se han llevado a cabo determinaciones de:

- peso de hígado
- lípidos totales hepáticos (tabla 7)
- lípidos totales circulantes (tabla 8) (figura 6)
- incorporación de (1-<sup>14</sup>C)-acetato a lípidos hepáticos y a lípidos circulantes así como su distribución en las diferentes fracciones lipídicas - (fosfolípidos, diglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos y ésteres de colesterol.
- análisis de los ácidos grasos en los lípidos tisulares hepáticos.

Los resultados obtenidos en estas condiciones nos muestran que la incorporación total de (1-<sup>14</sup>C)-acetato a los

Peso Rata g	Peso Hígado g	Lípidos Totales mg	mg.L.T./g. hígado mg/g.
219	7.9	294	37.21
200	7.0	256	36.57

Tabla nº 7.- Ratas hembras **controles**.Perfusión del hígado con 1mCi de  $^{14}\text{C}$ -acetato. Peso de los animales, peso del hígado, lípidos totales del hígado y contenido lipídico por g. de tejido hepático.

Tiempo		5'		10'		15'		20'		50'	
Muestra		S	E	S	E	S	E	S	E	S	E
Controles	(1)	1.0	1.0	1.1	1.0	1.3	1.3	1.3	1.2	1.4	1.4
	(2)	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.3	1.2

Tabla nº 8.- Ratas hembras **controles**.mg. de lípidos totales/ 5 ml. de medio de perfusión en los diferentes tiempos durante la experiencia. E = entradas (muestra recogida del vaso colector) S = salidas (muestra recogida a la salida del hígado).

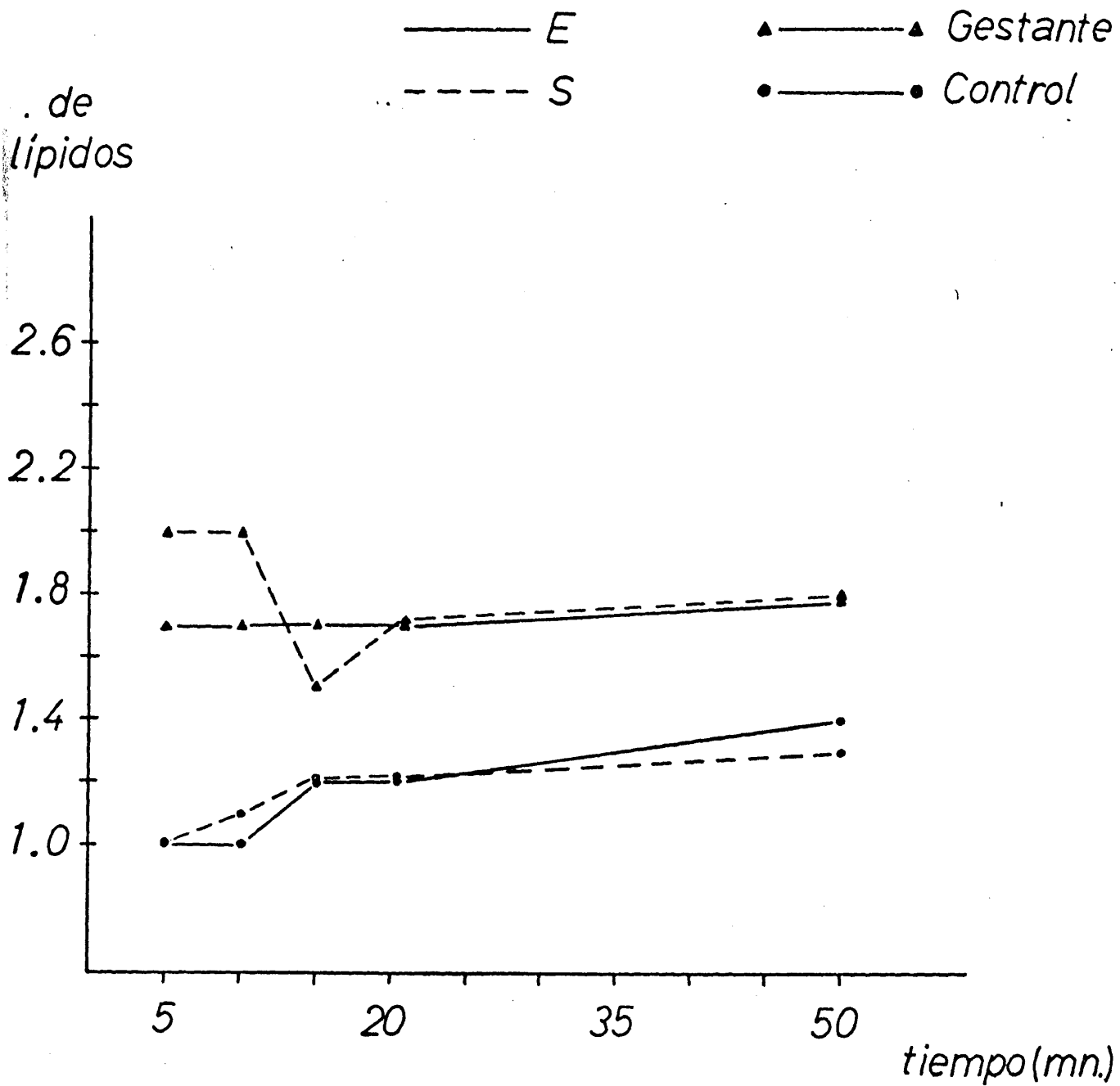


Figura 6.- Lípidos totales circulantes durante el tiempo de perfusión en ratas controles y gestantes. Los valores vienen expresados en mg de lípidos totales/5ml de medio de perfusión (perfusión con 1mCi de (1-<sup>14</sup>C)acetato).



lípidos totales hepáticos al final de la experiencia representa un 6,8% ~~por~~ término medio frente al 5% que habíamos - observado en el apartado 1, análogamente, la incorporación a los lípidos circulantes fué del 1,35% frente a 0,4%.

Los resultados de incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato en las diferentes fracciones lipídicas se reúnen en las tablas 9 y 10, y se representan graficamente en las figuras 7 (a) (b) y 8(a) (b). En ellas se observa claramente una cierta constancia del máximo nivel de incorporación, a lo largo del tiempo de perfusión, en la fracción de ácidos grasos libres; resultados que cualitativamente se corresponden con los de la experiencia anterior y que, al igual que antes, los ácidos grasos isotopicamente marcados recién sintetizados han - de incorporarse a diglicéridos, triglicéridos y fosfolípidos. Hay que destacar asimismo como la biosíntesis de los triglicéridos es la que exhibe una mayor pendiente en la incorporación isotópica durante el intervalo de tiempo 10-20 minutos en que todas las clases de lípidos experimentan un agudo cambio en la pendiente de incorporación. De esta manera, los niveles de incorporación isotópica en los triglicéridos llegan a igualar prácticamente a los de los ácidos grasos libres en los momentos finales del ensayo y que incluso puede llegar a ser sobrepasada en algunas experiencias.

El mayor número de puntos experimentales de esta segunda serie de ensayos ha posibilitado el conocimiento de la singular forma de incorporación isotópica en las clases de lípidos en el medio de perfusión, reflejo indudable de la disponibilidad enzimática del hígado.

Si consideramos la distribución porcentual de la radiactividad incorporada en cada una de las clases de lípidos presentes en el medio de perfusión (fig. 7c y 8c) observamos que los fosfolípidos se mantienen constantes o sufren una ligera disminución. Lo mismo sucede a los diglicéridos.

El colesterol experimenta un ligero aumento desde un 6% a un 14%. Por el contrario los ácidos grasos libres caen espectacularmente desde un 70% aproximadamente hasta un 25%. Los triglicéridos aumentan en valor relativo desde un 2,5% hasta un 32%. Todo ello de acuerdo con el comportamiento - precursor de los ácidos grasos libres en la biosíntesis de acilgliceroles y fosfolípidos y con la posición intermedia singular de los diglicéridos en las relaciones metabólicas de estas clases de lípidos.

Por lo que se refiere a la incorporación isotópica en las clases de lípidos presentes en el tejido hepático, (tablas 9 y 10) la fracción lipídica con mayor grado de incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato es el colesterol, hecho perfectamente explicable si tenemos en cuenta su continuo - recambio debido a su paso desde el hígado a la sangre y a la bilis. Los fosfolípidos ocupan el tercer lugar en cuanto al nivel de incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato y su dinámica - en el hígado queda reflejada en los valores particulares circulantes, observados para esta fracción.

Los esteres de colesterol que en el medio de perfusión no mostraban radiactividad apreciable, sí la presentaban en el hígado y representa el 4% de la total incorporada en el órgano al final de la experiencia.

FRACCIONES LIPIDICAS							
Tiempo min.	Muestra	PL	DG	Ch	FFA	TG	ChE
5	E	856 (10)	169 (2)	468 (6)	6.683 (79)	239 (3)	-
	S	1.025 (8)	281 (2)	1.211 (9)	9.952 (77)	308 (2)	-
10	E	1.115 (9)	248 (2)	1.925 (15)	8.890 (70)	3.393 (3)	-
	S	1.060 (6)	426 (2)	3.966 (21)	12.251 (65)	1.002 (5)	-
15	E	4.234 (15)	1.044 (4)	5.545 (19)	16.526 (58)	1.028 (4)	-
	S	3.524 (5)	1.029 (2)	11.157 (18)	36.258 (58)	10.332 (17)	-
20	E	2.856 (5)	875 (1)	10.846 (17)	40.044 (62)	11.824 (19)	-
	S	3.924 (3)	1.169 (1)	17.218 (14)	66.136 (56)	28.966 (25)	-
50	E	16.546 (4)	2.895 (1)	69.997 (16)	173.951 (41)	160.505 (37)	-
	S	13.378 (2)	4.447 (1)	82.456 (14)	189.219 (33)	272.392 (48)	-
HIGADO		58.050 (25)	10.876 (5)	88.525 (38)	2.018 (1)	63.893 (28)	6.829 (3)

Tabla n° 9.- Rata control (1). Hígado perfundido con 1m Ci de <sup>14</sup>C-acetato. Valores de incorporación de <sup>14</sup>C a fracciones lipídicas circulantes a lo largo de la experiencia y a fracciones lipídicas tisulares hepáticas al final de la misma, expresados en Dpm/0,5 mg de lípidos totales. Los números entre paréntesis representan el valor relativo de incorporación, considerando el 100% la radiactividad total incorporada en cada tiempo.

FRACCIONES LIPIDICAS

Tiempo min.	Muestra	PL	DG	Ch	FFA	TG	ChE
5	E	1.327 (16)	1.233 (14)	489 (6)	5.206 (62)	136 (2)	-
	S	1.390 (25)	516 (9)	250 (5)	3.217 (59)	100 (2)	-
10	E	2.382 (19)	1.331 (11)	1.232 (10)	7.056 (58)	200 (2)	-
	S	3.863 (25)	1.356 (9)	2.429 (16)	6.985 (46)	492 (3)	-
15	E	7.667 (27)	3.778 (14)	4.268 (15)	9.675 (35)	2.216 (8)	-
	S	9.946 (22)	4.874 (11)	7.839 (17)	13.900 (31)	8.422 (19)	-
20	E	22.651 (29)	8.548 (11)	12.699 (17)	18.713 (25)	13.709 (18)	-
	S	34.157 (31)	14.088 (13)	14.864 (14)	22.893 (21)	22.116 (21)	-
50	E	65.496 (18)	25.029 (7)	50.318 (14)	46.812 (13)	177.409 (48)	-
	S	64.637 (19)	17.939 (5)	46.627 (14)	44.442 (13)	161.746 (48)	-
HIGADO		14.058 (5)	3.284 (1)	157.040 (61)	3.320 (1)	67.191 (26)	13.794 (5)

Tabla n° 10.- Rata control (2). Hígado perfundido con 1mCi de <sup>14</sup>C-acetato. Valores de incorporación de <sup>14</sup>C a fracciones lipídicas circulantes a lo largo de la experiencia y a fracciones lipídicas tisulares hepáticas al final de la misma, expresados en Dpm/0,5 mg de lípidos totales. Los números entre paréntesis representan el valor relativo de incorporación, considerando el 100% la radiactividad total incorporada en cada tiempo.

$10^6$

$10^4$

$10^3$

$10^2$

Figura 7(a).

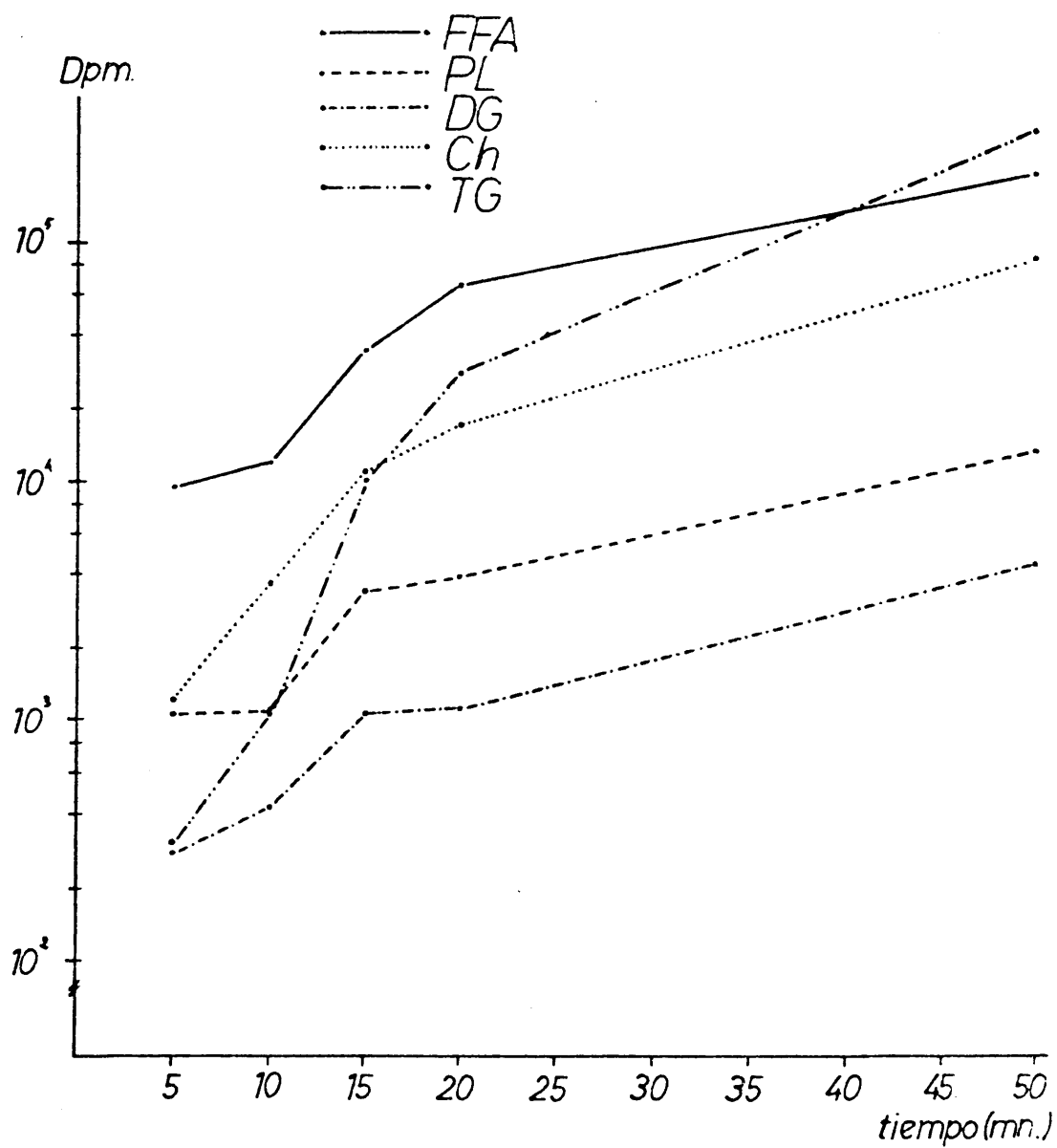


Figura 7 (b).- Rata control (1). Explicaciones como la figura 7(a) para las muestras de Salida (S).

10

10

10

10

Figura 8(a)

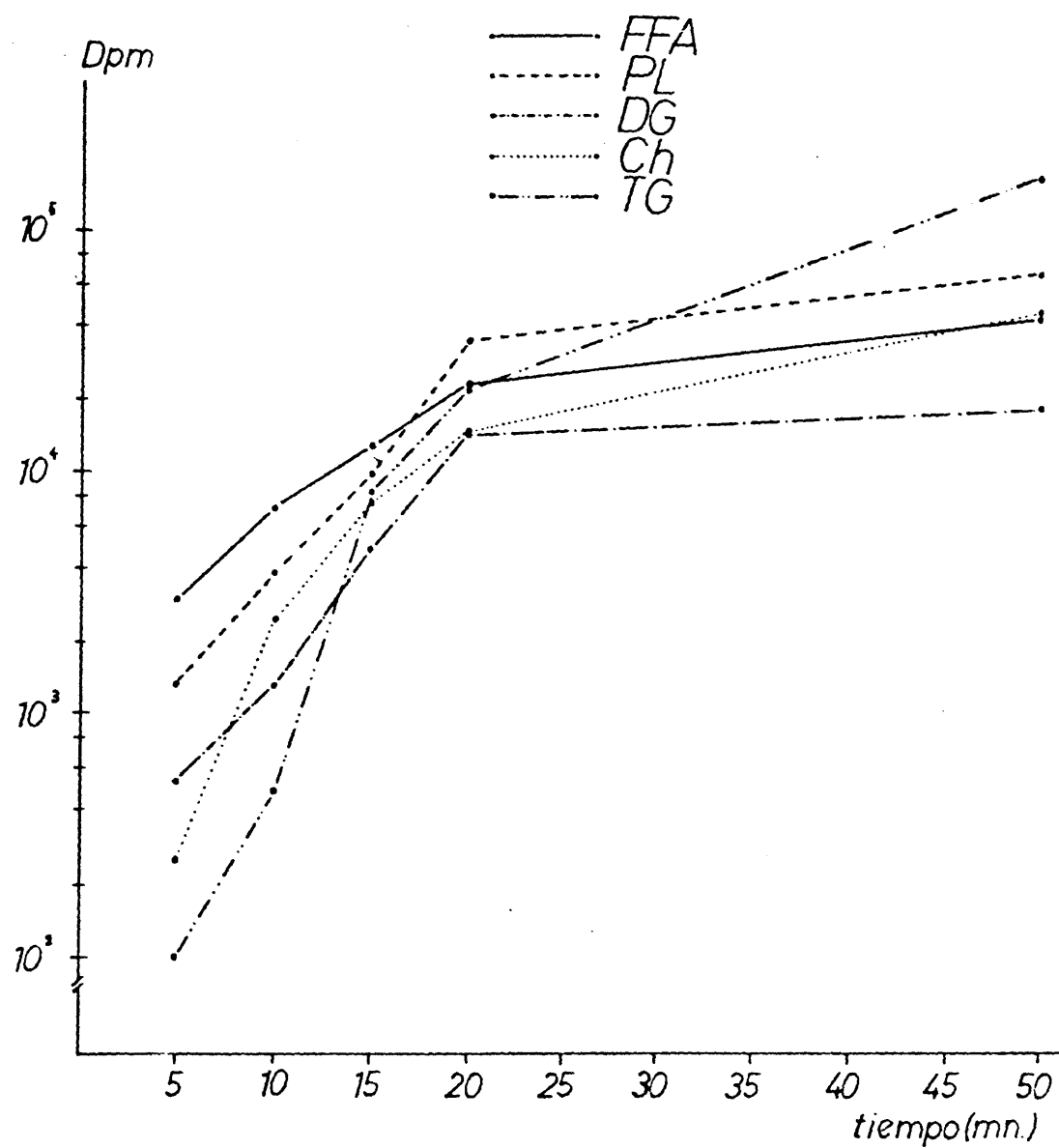


Figura 8(b).- Rata control (2). Explicaciones como la figura 8(a) para las muestras de Salida (S).



Figura 7(c)

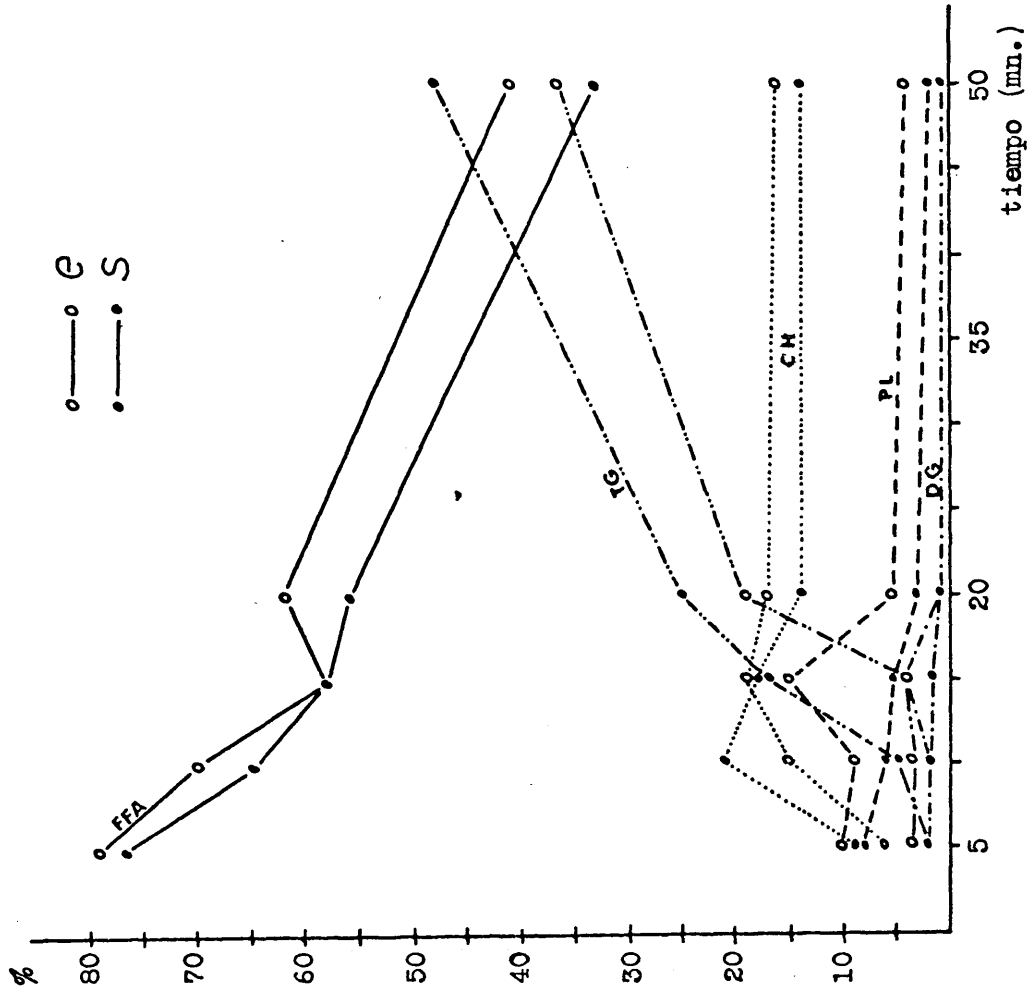
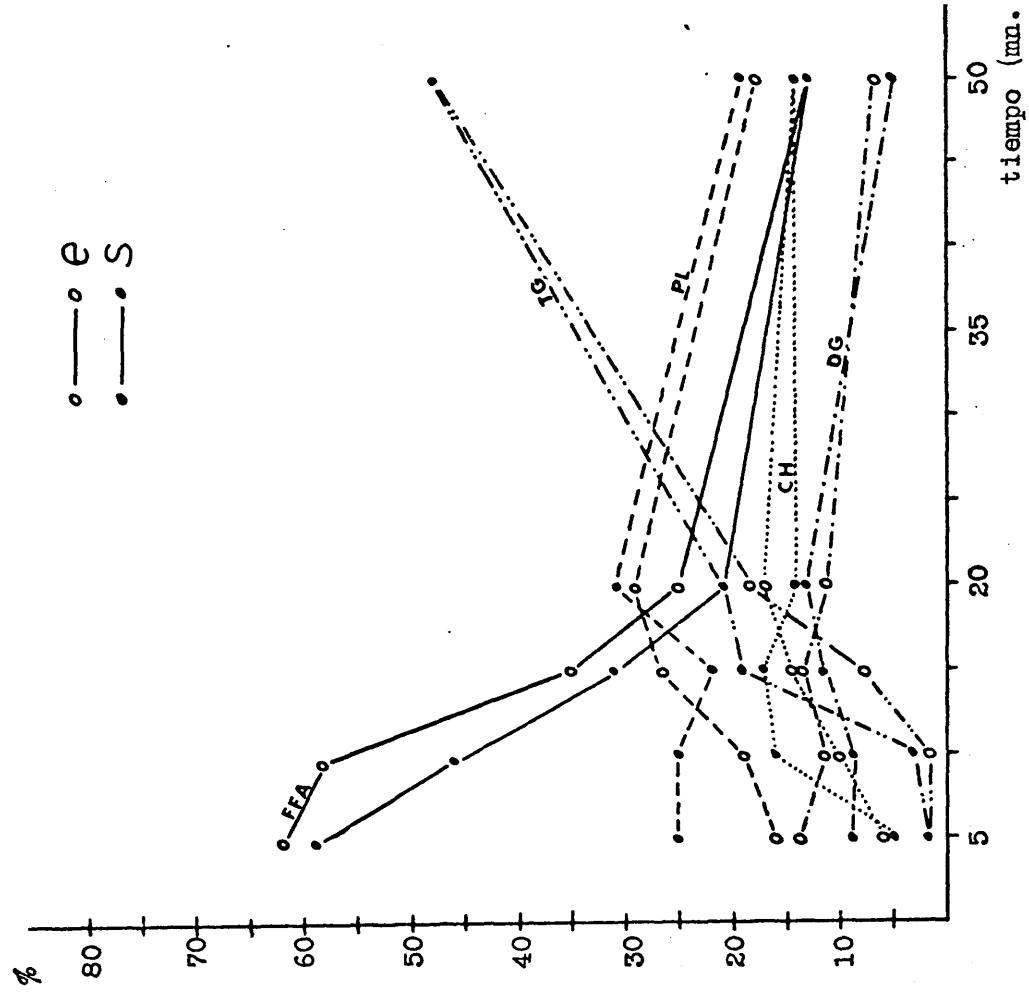


Figura 8(c)



Ratas control (1) y (2). Hígado perfundido con 1mCi de (1- $^{14}\text{C}$ )acetato. Valores relativos de incorporación de  $^{14}\text{C}$  a fracciones lipídicas circulantes considerando el 100% la radiactividad incorporada en cada tiempo. E = entradas, S = salidas.

### 3.1.2.2.- Ratas gestantes.

En este grupo de experiencias se han llevado a cabo las mismas determinaciones que las consignadas anteriormente (3.1.2.1) para el grupo de ratas control. De los resultados obtenidos se pone de manifiesto que:

El hígado de las ratas gestantes, como es sabido aumenta de tamaño, no obstante lo cual el aumento del contenido lipídico es muy poco marcado (tabla 11) y en consecuencía la cantidad de lípidos totales por gramos de órgano disminuye al compararla con la presentada por las ratas control.

Los lípidos circulantes en el medio de perfusión (tabla 12) durante el periodo experimental, son superiores a los de las ratas control y no experimentan cambios significativos (fig. 6) en los 50 minutos que dura el mismo.

El (1-<sup>14</sup>C) acetato incorporado en los lípidos hepáticos al final de la experiencia, representa en 3,7% de la cantidad administrada, valor que se reduce aproximadamente un 50% del obtenido para las ratas control (fig. 9), analogamente la incorporación a los lípidos circulantes representa el 0,2% frente al 1,35 para las ratas controles.

El hecho más notable que aparece cuando se analizan las fracciones lipídicas circulantes es que, a los 5 minutos de adicionar el sustrato es la fracción de fosfolípidos la que presenta una mayor incorporación, primacía que - en los experimentos con ratas controles correspondía a los ácidos grasos libres. (tablas 13 y 14). (figs. 10 a,b y 11 a, b).

Peso Rata g	Peso hígado g	Lípidos Totales mg	mg.L.T./g. hígado mg/g.
363	12.0	304	25.33
300	10.4	355	34.09

Tabla n° 11.- Ratas hembras gestantes. Perfusión del hígado con 1mCi de  $^{14}\text{C}$ -acetato. Peso de los animales, peso del hígado, lípidos totales del hígado y contenido lipídico por g. de tejido hepático.

Tiempo Muestra	5'		10'		15'		20'		50'	
	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E
Gestantes (3)	2,0	1,3	1,9	1,4	1,1	1,5	1,6	1,4	1,5	1,6
(4)	1,9	2,0	2,0	2,0	1,8	1,8	1,8	2,0	2,0	2,0

Tabla n° 12.- Ratas gestantes. mg. de lípidos totales/5 ml. de medio de perfusión en los diferentes tiempos durante la experiencia. E = entradas (muestra recogida del vaso colector) S = salidas (muestra recogida a la salida del hígado).

Otro aspecto interesante a destacar es la variación de radiactividad que exhiben fosfolípidos y triglicéridos en dependencia del momento de control del líquido de perfusión en las muestras tomadas del reservorio denominadas de entrada (E) y en las de medio de perfusión a la salida del hígado (S) (tablas 13 y 14). La fracción fosfolipídica presenta en el minuto 50 una actividad 5 veces superior, aproximadamente, a la inicial en las muestras de (E), por el contrario en las muestras de (S) la actividad de dicha fracción en el minuto 50 está considerablemente disminuida. Coincidiendo con el fenómeno señalado en los fosfolípidos, la fracción de triglicéridos presenta un comportamiento inverso, es decir, el valor de radiactividad que presenta esta fracción en la sangre que entra al hígado, queda aumentado 3-5 veces cuando abandona el mismo (S). Estos hechos altamente sorprendentes los hemos observado repetidamente y creemos, por lo tanto, que no son ocasionales.

La interpretación más sencilla sería la de considerar que el hígado está utilizando los fosfolípidos circulantes para la síntesis de triglicéridos. Este hecho podría estar de acuerdo con los resultados obtenidos por ACEBAL y col. (1973) que ponen de manifiesto que al final de la gestación en conejas los triglicéridos plasmáticos se elevan a la vez que disminuye la fracción fosfolipídica.

Las figuras 10c y 11c, recogen los valores relativos de radiactividad considerando el 100% la radiactividad total incorporada en cada tiempo; las gráficas correspondientes a los fosfolípidos experimentan una disminución a lo largo del tiempo a la vez que las de los triglicéridos aumentan.

El perfil de la curva correspondiente a ácidos grasos libres, es totalmente diferente al que presentaron -

las ratas no gestantes y su análisis hace pensar que los ácidos grasos libres son utilizados de forma más rápida y temprana para la síntesis de fosfolípidos y demás fracciones.

Los valores relativos correspondientes a las diferentes fracciones lipídicas hepáticas de las ratas gestantes (tabla 13 y 14) y no gestantes (tabla 10 y 11) son prácticamente iguales y puesto que la fijación de radiactividad en el hígado de las ratas gestantes es aproximadamente la mitad - que en el de las controles, podría deducirse que los coeficientes de recambio en aquéllas son menores.

La tabla 15 representada en la fig. 12 recoge los valores de radiactividad de las diferentes fracciones lipídicas hepáticas expresados en Dpm/g de tejido, mostrando la rata gestante valores inferiores en general, si bien el nivel de incorporación de (1-<sup>14</sup>C) acetato para fosfolípidos presenta una dinámica que queda reflejada en los valores particulares circulantes observados para esta fracción.

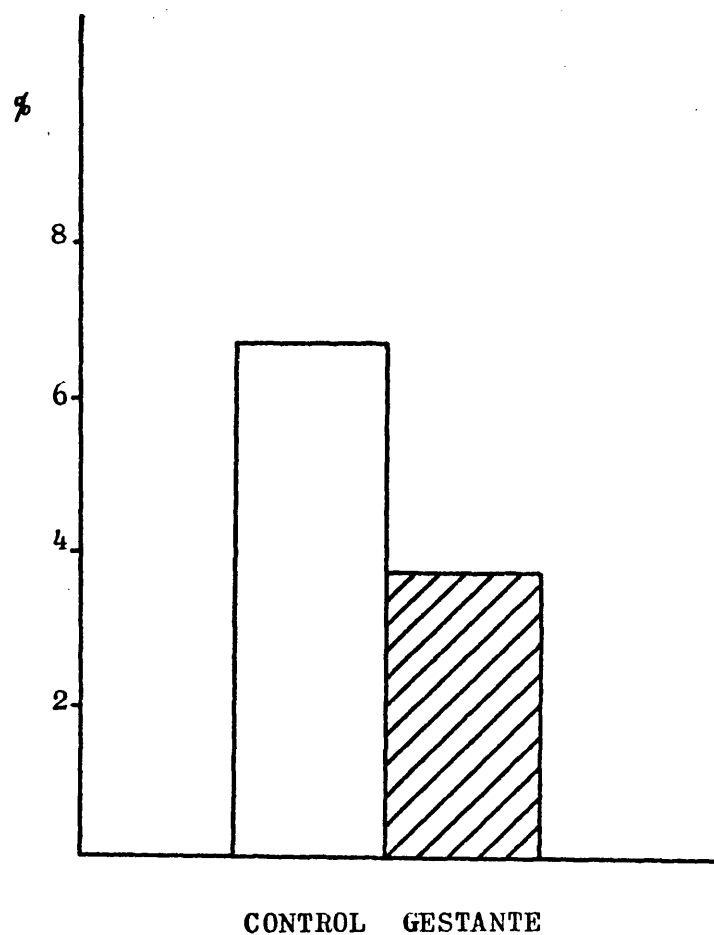


Figura 9.- Representa el % de  $^{14}\text{C}$ -acetato utilizado por el hígado perfundido durante 50 minutos con 1mCi de  $(1\text{-}^{14}\text{C})$ -acetato, en ratas controles y gestantes.

FRACCIONES LIPIDICAS

Tiempo min.	Muestra	PL	DG	Ch	FFA	TG	ChE
5	E	6.697 (75)	1.023 (11)	138 (2)	472 (5)	593 (7)	-
	S	4.565 (60)	1.176 (15)	189 (2)	963 (13)	673 (9)	-
10	E	4.603 (70)	770 (12)	105 (2)	662 (13)	434 (9)	-
	S	5.779 (60)	1.373 (14)	386 (7)	1.452 (15)	685 (7)	-
15	E	7.247 (65)	1.051 (9)	635 (6)	1.324 (12)	835 (8)	-
	S	8.654 (41)	3.628 (17)	1.857 (9)	4.006 (19)	2.732 (13)	-
20	E	9.898 (58)	1.884 (11)	1.411 (8)	2.624 (15)	1.062 (6)	-
	S	8.831 (41)	2.773 (13)	1.972 (9)	3.914 (18)	3.856 (18)	-
50	E	34.050 (55)	7.900 (13)	5.857 (9)	4.757 (8)	9.197 (15)	-
	S	9.604 (12)	6.334 (13)	10.148 (13)	7.028 (9)	42.819 (56)	-
HIGADO		27.034 (25)	5.612 (5)	38.323 (35)	3.354 (3)	33.269 (30)	1.575 (2)

Tabla n° 13.- Rata gestante (3). Hígado perfundido con 1mCi de  $^{14}\text{C}$ -acetato. Valores de incorporación de  $^{14}\text{C}$  a fracciones lipídicas circulantes a lo largo de la experiencia y a fracciones lipídicas tisulares hepáticas al final de la misma, expresados en Dpm/0,5 mg de lípidos totales.

Los números entre paréntesis representan el valor relativo de incorporación, considerando el 100% la radiactividad total incorporada en cada tiempo.

FRACCIONES LIPIDICAS

Tiempo min.	Muestra	PL	DG	Ch	FFA	TG	ChE
5	E	3.159 (58)	203 (4)	93 (2)	1.587 (29)	395 (7)	-
	S	2.262 (45)	190 (4)	181 (4)	2.082 (41)	297 (6)	-
10	E	2.544 (46)	324 (6)	377 (7)	1.970 (36)	267 (5)	-
	S	2.076 (38)	578 (8)	965 (14)	2.531 (36)	291 (4)	-
15	E	3.262 (34)	1.197 (13)	1.008 (11)	3.092 (33)	931 (10)	-
	S	4.810 (39)	1.095 (10)	2.018 (15)	3.272 (21)	1.196 (10)	-
20	E	5.210 (41)	1.308 (10)	2.018 (16)	2.783 (23)	1.368 (11)	-
	S	7.567 (35)	2.714 (12)	4.266 (20)	3.793 (17)	3.493 (16)	-
50	E	22.213 (48)	6.304 (14)	13.680 (29)	2.980 (6)	12.345 (26)	-
	S	2.831 (5)	1.193 (2)	12.629 (24)	3.147 (6)	33.343 (63)	-
HIGADO		25.651 (28)	19.131 (21)	19.208 (21)	1.847 (2)	23.619 (26)	971 (1)

Tabla n° 14.- Rata gestante (4). Hígado perfundido con 1mCi de <sup>14</sup>C-acetato. Valores de incorporación de <sup>14</sup>C a fracciones lipídicas circulantes a lo largo de la experiencia y a fracciones lipídicas tisulares hepáticas al final de la misma, expresados en Dpm/0,5 mg de lípidos totales. Los números entre paréntesis representan el valor relativo de incorporación, considerando el 100% la radiactividad total incorporada en cada tiempo.



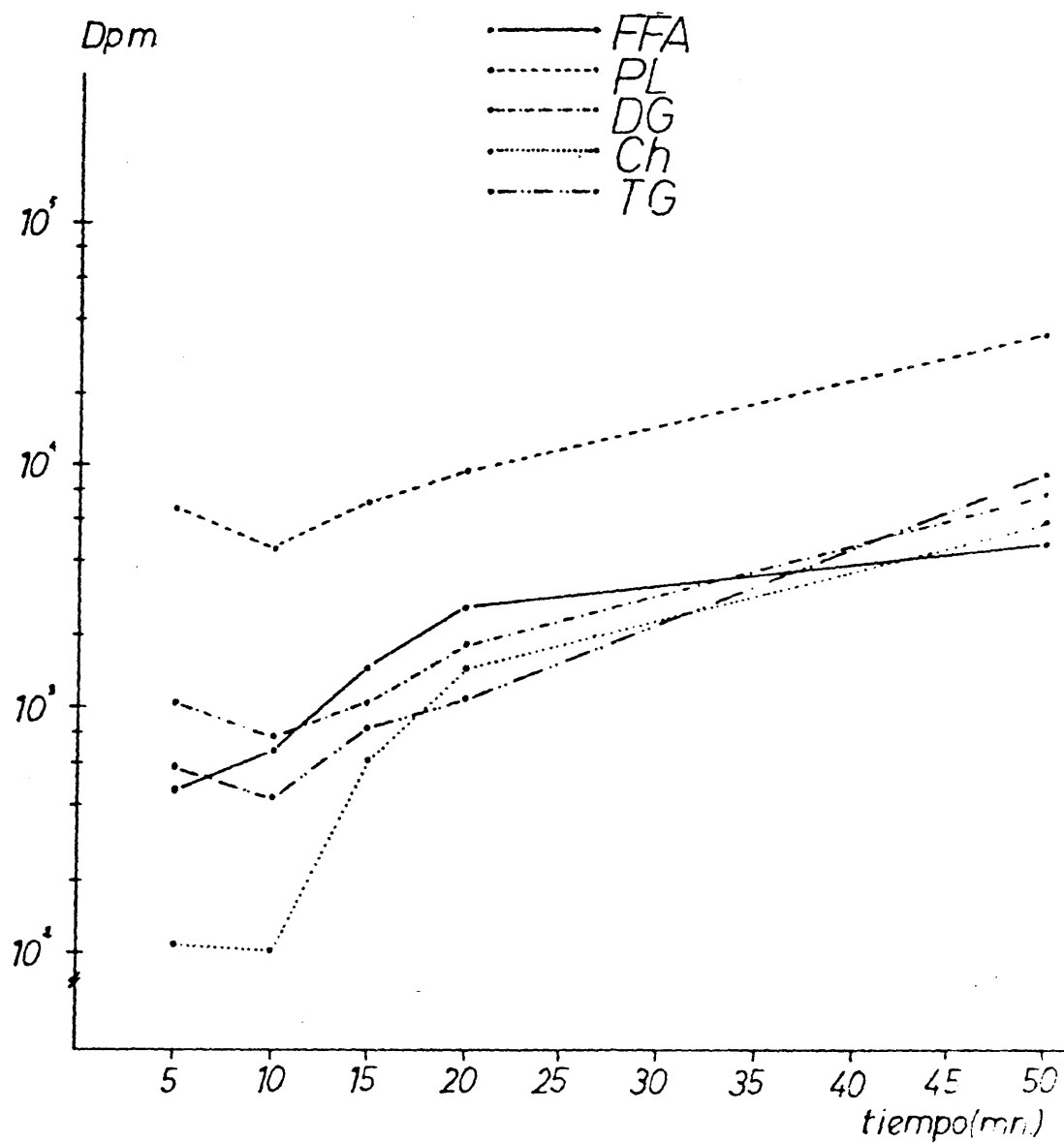


Figura 10(a).- Rata gestante (3). Hígado perfundido con 1mCi de (1- $^{14}$ C) Acetato. Valores de incorporación a fracciones lipídicas circulantes para las muestras denominadas de Entrada (E), expresados en Dpm/0,5 mg de lípidos totales.

10°

10°

Figura 10(

F

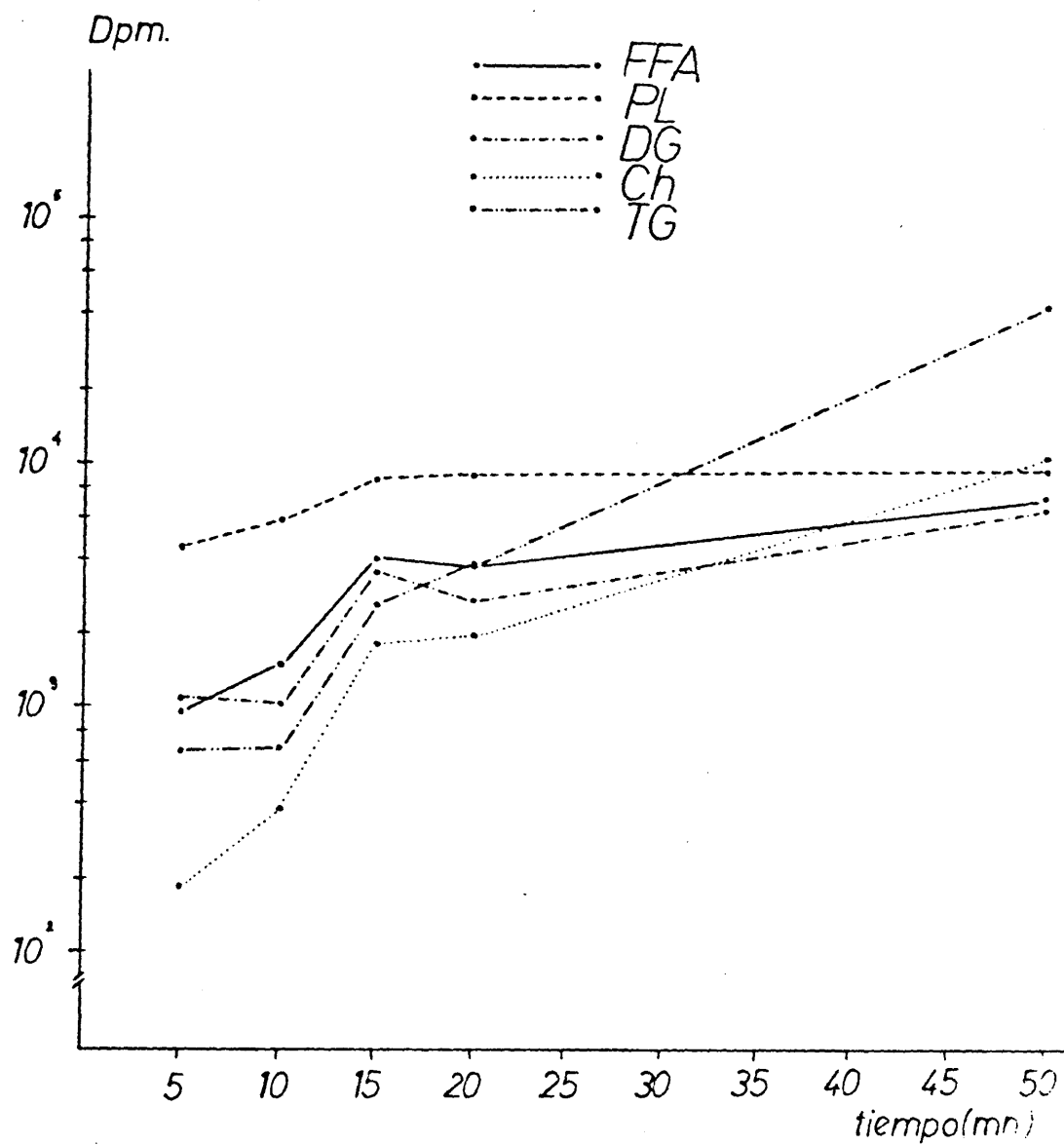


Figura 10(b).- Rata gestante (3). Explicaciones como la figura 10(a) para las muestras de Salida (S).

$10^4$

$10^4$

$10^4$

Figura 11(a).

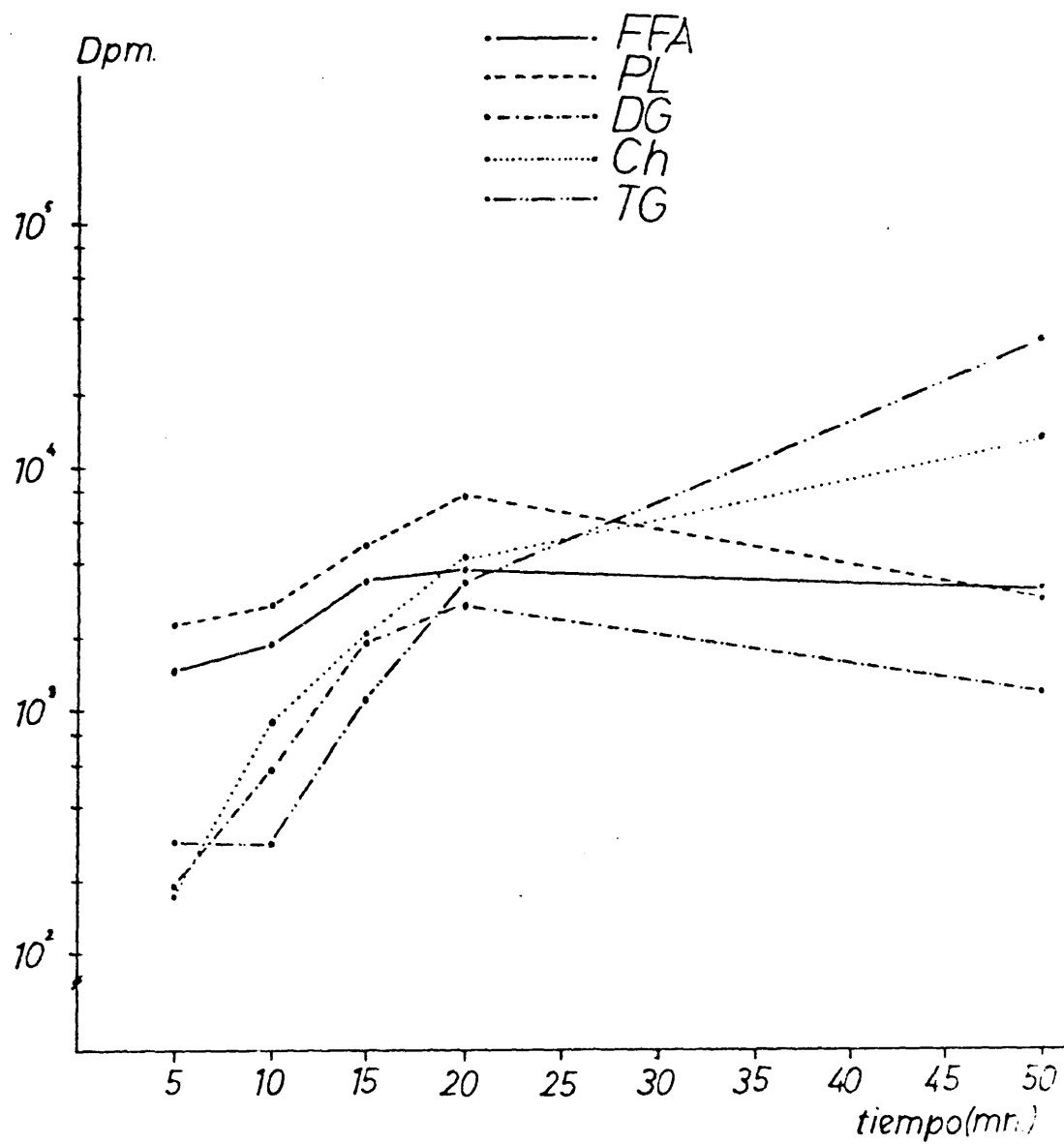


Figura 11(b).- Rata gestante (4). Explicaciones como la figura 11(a) para las muestras de Salida (S).

Figura 10(c)

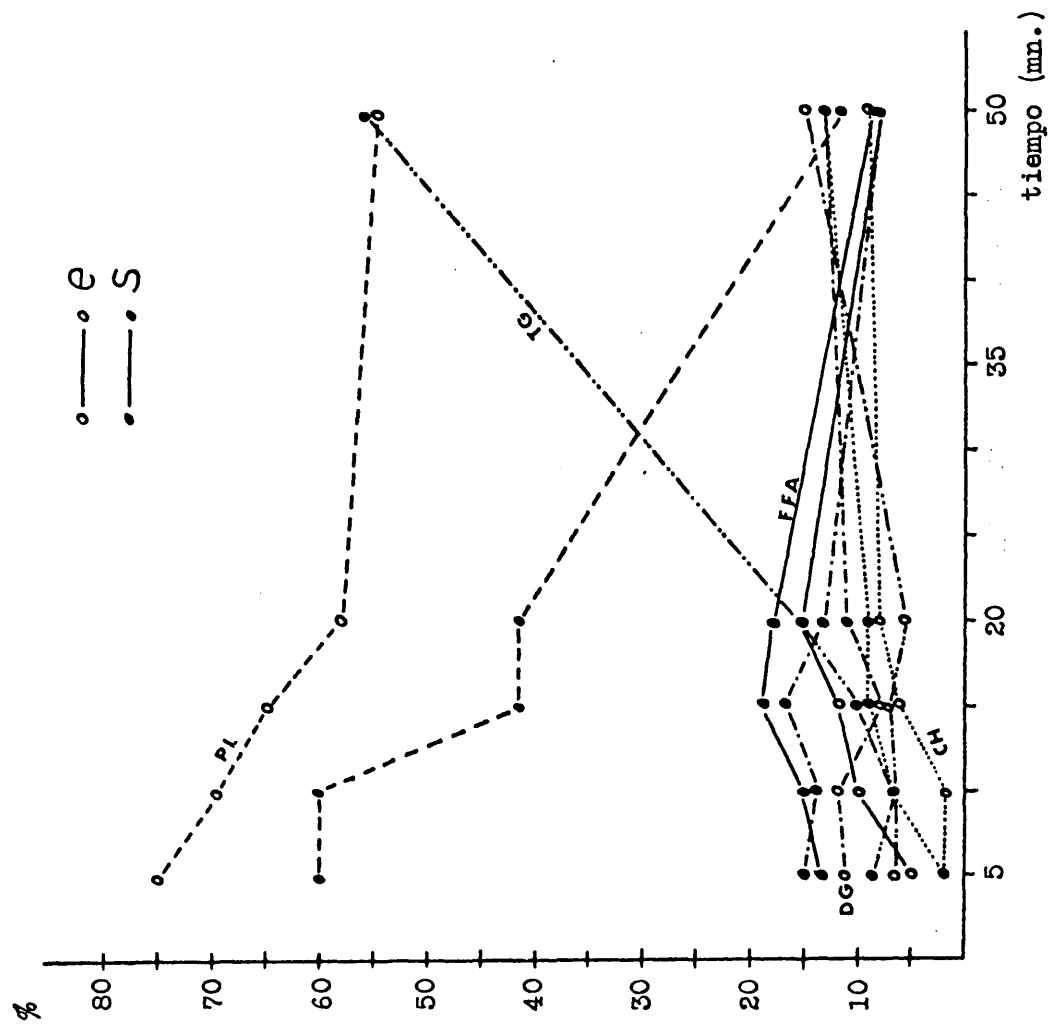
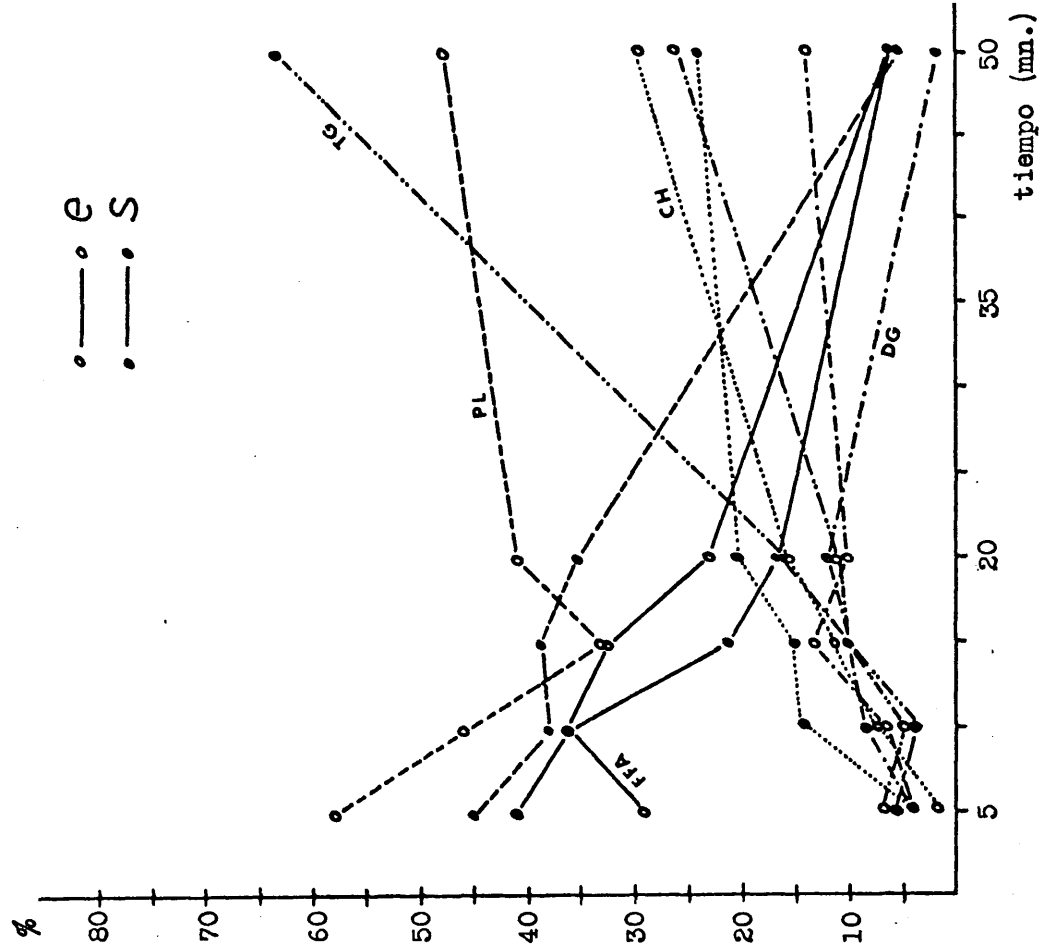


Figura 11(c)



Ratas gestantes (3) y (4). Hígado perfundido con 1mCi de (1-<sup>14</sup>C)-acetato. Valores relativos de incorporación a fracciones lipídicas circulantes, considerando el 100% la radiactividad total incorporada en cada tiempo. (E)=entrada. (S)=salidas.

Fracciones lipídicas								
	PL	DG	Ch	FFA	TG	ChE	%Total	$\bar{M}$ de %
Controles	432	80	658	15	475	50	6,8%	6,7%
	102	24	1.148	24	491	100	6,6%	
Gestantes	198	41	280	24	243	11	3,4%	3,7%
	204	15	153	14	188	7	3,9%	

Tabla n° 15.- Representa la incorporación de (1-<sup>14</sup>C)acetato a las diferentes fracciones lipídicas hepáticas, los valores vienen expresados en Dpm por 10<sup>4</sup>/g de hígado. Los porcentajes representan la cantidad total de sustrato utilizado.

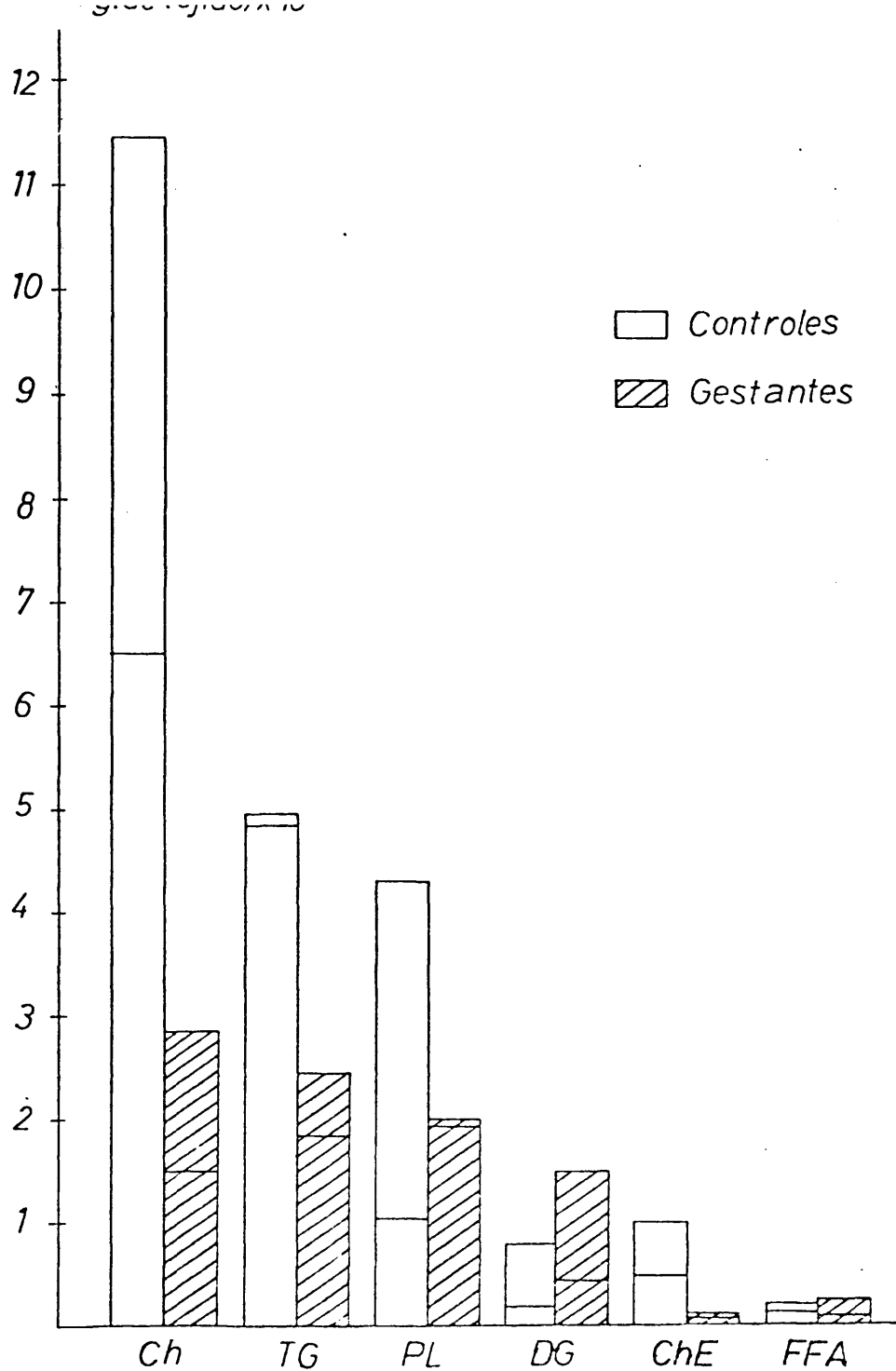


Figura 12.- Representa los valores de incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$ -acetato en Dpm/g de hígado en las diferentes fracciones lipídicas hepáticas en ratas controles y gestantes.



### 3.1.2.3.- Análisis de ácidos grasos en lípidos totales de hígado.

En el análisis de ácidos grasos de lípidos totales hepáticos procedentes de ratas normales y gestantes se han hecho dos tipos de determinaciones:

- 1.- Composición de ácidos grasos. (tabla 16)
- 2.- Porcentaje de incorporación de (1-<sup>14</sup>C)-acetato, a los diferentes ácidos grasos. (tabla 17).

- 1.- Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto (fig. 13) que la composición de ácidos grasos en lípidos hepáticos viene modificada por la gestación de la siguiente manera: el porcentaje de ácido palmítico en la rata gestante es de 24,3 frente a 21,5 en la control. El ácido esteárico, por el contrario, presenta un valor inferior en gestantes: el 20% frente a un 22% para control. Variación que, aunque ligera, es significativa y está cualitativamente de acuerdo con los cambios que induce la gestación en el hígado de conejas (ACEBALy col., 1973), así como los observados por SMITH y WALSH (1975) en rata y oveja gestante. SMITH y WALSH igualmente han observado un aumento de ácido palmítico en lípidos hepáticos al final de la gestación en rata.

Las diferencias más notables en la composición de ácidos grasos insaturados, la presentaron los ácidos - 24:1 y 22:6, siendo superior en gestantes que en control; los ácidos oleico y palmitoleico no presentaron variación entre los dos grupos.

ACIDOS GRASOS	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4	24:1	22:6
Control	0,8	21,5	0,6	22,0	12,4	16,0	20,0	-	6,2
Gestante	0,3	24,3	0,9	20,0	12,3	10,0	21,0	3,0	14,0

Tabla n° 16.- Composición (%) de ácidos grasos en lípidos totales hepáticos en ratas control y gestantes.

ACIDOS GRASOS	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1
Control	20	49	3	18	9
Gestante	15	42	7	24	12

Tabla n° 17.- Porcentaje de incorporación de (1-<sup>14</sup>C) acetato en ácidos grasos de lípidos totales hepáticos en ratas control y gestantes.

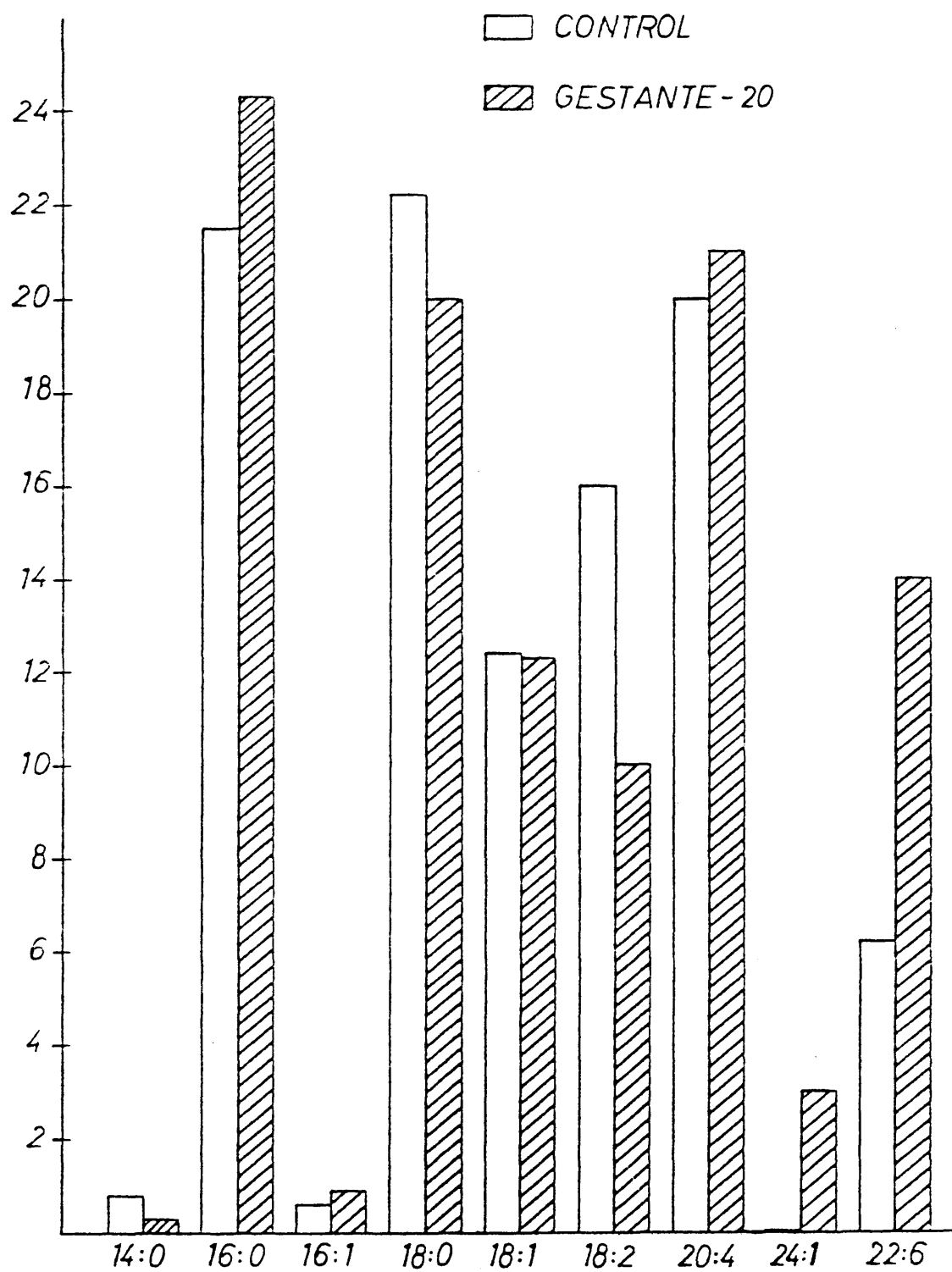


Figura 13.- Composición de ácidos grasos en lípidos totales hepáticos en animales control y gestantes.

2.- El porcentaje de incorporación de (1-<sup>14</sup>C) acetato a los diferentes ácidos grasos muestra que: los valores para los ácidos saturados mirístico y palmítico disminuyen en la rata gestante a diferencia del esteárico que presenta valores de un 18% para control frente a un 24% en gestantes. (fig. 14).

Respecto al porcentaje de incorporación en los ácidos grasos insaturados, la rata gestante presenta valores superiores para los ácidos palmitoleico y oleico con valores de 7% y 12% respectivamente frente a 3% y 9% para la rata control.

Se ha calculado el grado de insaturación expresado como  $\Delta = \% \text{ ácidos monoicos}/100 + \% \text{ ácidos dienoicos}/100 + \% \text{ ácidos trienoicos}/100 \dots$  y los resultados obtenidos presentaron que la rata gestante muestra un mayor grado de insaturación, tanto para el porcentaje de masa, como para el porcentaje de incorporación:

	<u>Control</u>	<u>Gestante</u>
$\Delta = \text{MASA}$	1,6	2,1
$\Delta = \text{INCORPORACION}$	0,1	1,0

Es de suponer que el superior incremento en la insaturación de los lípidos hepáticos de la rata gestante está de acuerdo con el hecho de que la incorporación de (1-<sup>14</sup>C) acetato a la fracción de fosfolípidos circulantes estuviera incrementada a los 5 minutos de añadir el sustrato y mantenga valores de radiactividad superiores al resto de las fracciones, dado que dicha fracción es responsable de una mayor insaturación. Observación que concuerda con la diferente variación

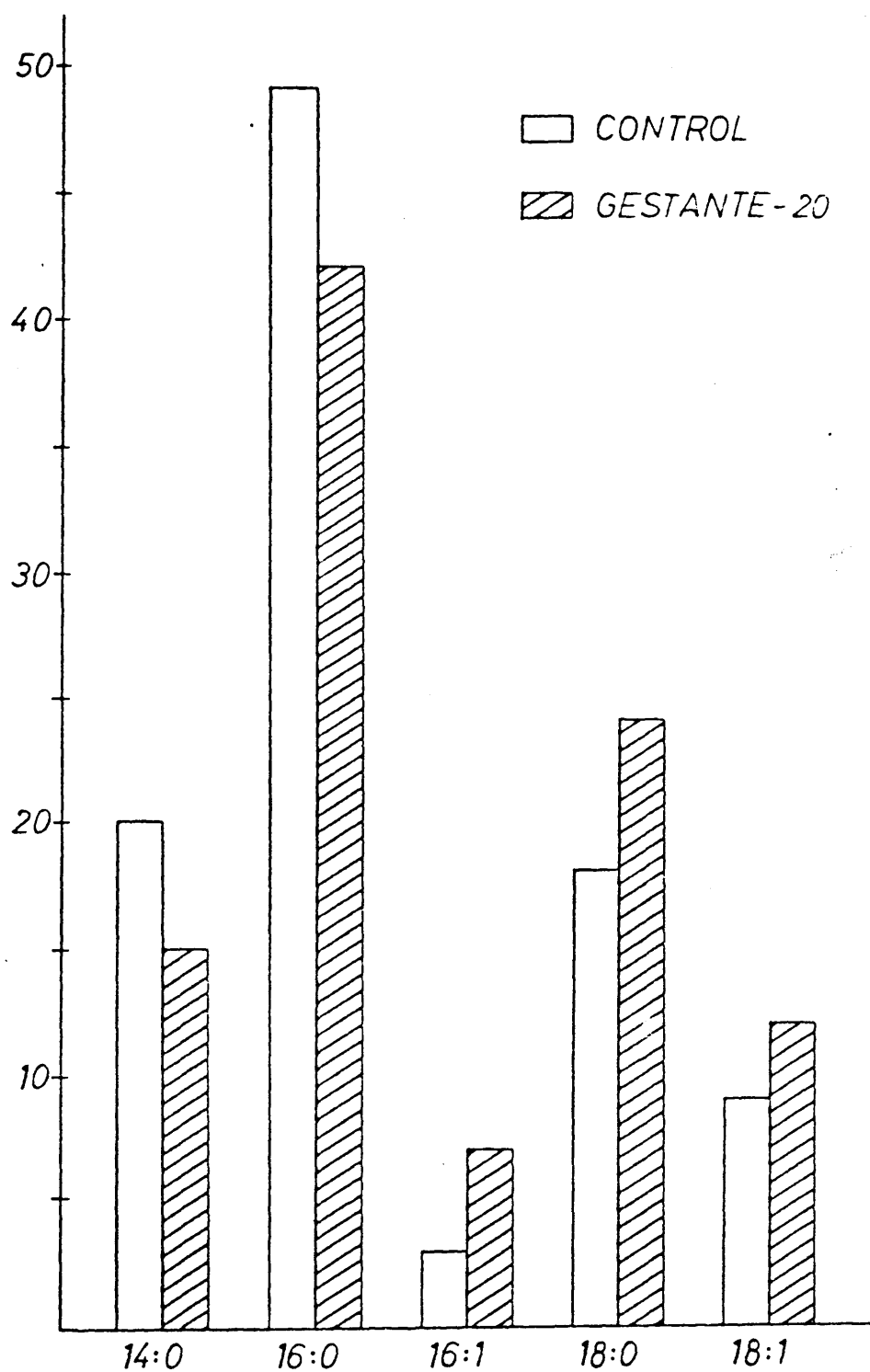


Figura 14.- Porcentaje de incorporación de (1-<sup>14</sup>C)-acetato en ácidos grasos de lípidos totales hepáticos durante los 50 minutos de perfusión, en ratas control y gestantes.

ción del grado de insaturación que exhiben triglicéridos y fosfolípidos en el hígado de conejas gestantes (ACEBAL y col., 1973), en la que hay que destacar como son precisamente los fosfolípidos los que presentan una notoria elevación de la insaturación.

El incremento en el grado de la insaturación se presenta también de forma notable en la incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato en ácidos grasos incorporados a los lípidos totales.

Ambas conclusiones reflejan una especial situación reguladora en la biosíntesis hepática de ácidos grasos y una incidencia hormonal sobre los mecanismos de desaturación. Como es sabido, los microsomas de hígado de rata tienen capacidad para convertir esteroil-CoA en oleil-CoA por una reacción enzimática que requiere oxígeno y la integridad de la cadena transportadora de electrones unida al NADH microsomal, del cual,  $\Delta 9$ -desaturasa es el componente terminal (WILSON y col., 1967).

Aparentemente, la capacidad del sistema enzimático de desaturación depende del componente proteico terminal y su control es mediado por la síntesis y degradación proteica (OSHINO y SATO, 1972). Este hecho podría explicar la adaptabilidad del hígado para diferentes condiciones fisiológicas en las cuales se requiera una actividad de desaturación microsomal determinada. Probablemente, uno de los mejores ejemplos de esto, es la respuesta de la  $\Delta 9$ -desaturasa en los estados de ayuno y posterior realimentación.

GELLHORN y BENJAMIN (1966) han demostrado que la desaturación oxidativa de los ácidos grasos saturados disminuye en el estado diabético, y que esta actividad enzimática

deteriorada recupera su normalidad con insulina. Puesto que la insulina recupera la actividad lipogénica disminuida en el estado diabético, se puede deducir que la insulina induce una elevación de la actividad de la desaturasa hepática media da por el incremento de la síntesis "de novo" de ácidos grasos.

Dado que la gestación lleva consigo una alteración del sistema endocrino con el consiguiente aumento de los niveles hormonales en general, y por consiguiente de insulina, sería presumible pensar que el comportamiento metabólico del hígado en el 20º día de gestación respecto al mayor grado de insaturación puesto de manifiesto, venga condicionado por es te estado fisiológico.

### 3.2.- EXPERIENCIAS "IN VIVO".

#### 3.2.1.- INYECCION INTRAVENOSA DE $10\mu\text{Ci}$ de $(1-^{14}\text{C})$ EN RATAS GESTANTES Y CONTROL.

Se ha fijado el tiempo de duración de la experiencia en 5 minutos ya que, en las experiencias previas, se encontró que la radiactividad de los lípidos hepáticos ofrece un máximo de incorporación en este tiempo. Este mismo hecho es observado por JONES (1974) después de una inyección intraperitoneal en cobayas gestantes de  $4\mu\text{Ci}$  de  $(1-^{14}\text{C})$  palmitato presentando a los cinco minutos de la misma un porcentaje - de incorporación en los lípidos hepáticos del 31,2% para disminuir a un 18,7% a los 20 minutos.

En este grupo se han llevado a cabo determinaciones de peso de hígado, de lípidos totales hepáticos y de la relación mg de lípidos totales/g de tejido hepático (tabla 18), asimismo se estudió la incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato a los lípidos hepáticos así como su distribución en las diferentes fracciones lipídicas (tabla 19).

Por lo que se refiere a la incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato a los lípidos totales hepáticos, representa un 3,9% para ratas control y un 1,6% para gestantes (fig. 16). Nuevamente, la utilización de dicho sustrato por la rata gestante es casi un 50% menor que para la rata control; este dato pues se repite al compararlo con el grupo de experiencias en hígado perfundido, si bien las condiciones experimentales son diferentes.

El fraccionamiento de los lípidos totales hepáticos permitió evaluar la incorporación isotópica en las cla-



	Peso rata g	Peso hígado g	Líp.Totales mg	Líp.Totales/Peso híg. mg/g
Normal	300	11,0	346	31,40
	465	14,3	478	32,60
Gestantes	333	10,0	372	37,20
	323	10,5	370	35,20

Tabla n° 18.- Experiencias "in vivo". Peso de los animales, peso del hígado, lípidos totales del hígado y contenido lipídico por gramo de tejido.

	PL	DG	Ch	FFA	TG	ChE	% Total
Control	17.960	-	3.868	3.868	45.672	-	3,9 %
Gestante	8.189	-	3.777	4.579	8.991	-	1,6 %

Tabla n° 19.- Representa los valores de las diferentes fracciones lipídicas hepáticas, expresados en Dpm/g de tejido hepático, Los porcentajes representan el % total utilizado de los 10 $\mu$ Ci de <sup>14</sup>C-acetato inyectados.

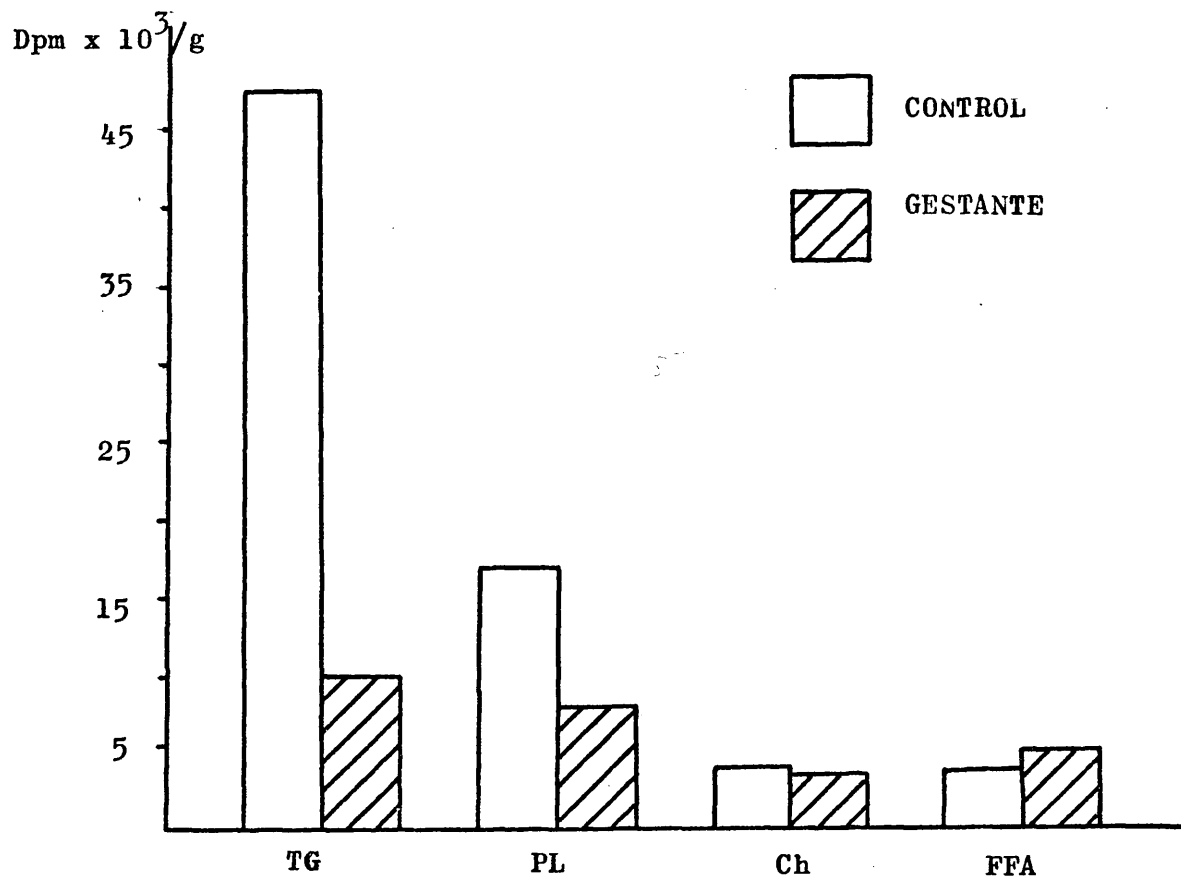


Figura 15.- Experiencias "in vivo". Representa los valores de incorporación (1-<sup>14</sup>C)-acetato a fracciones lipídicas hepáticas, expresados en Dpm/g de hígado.

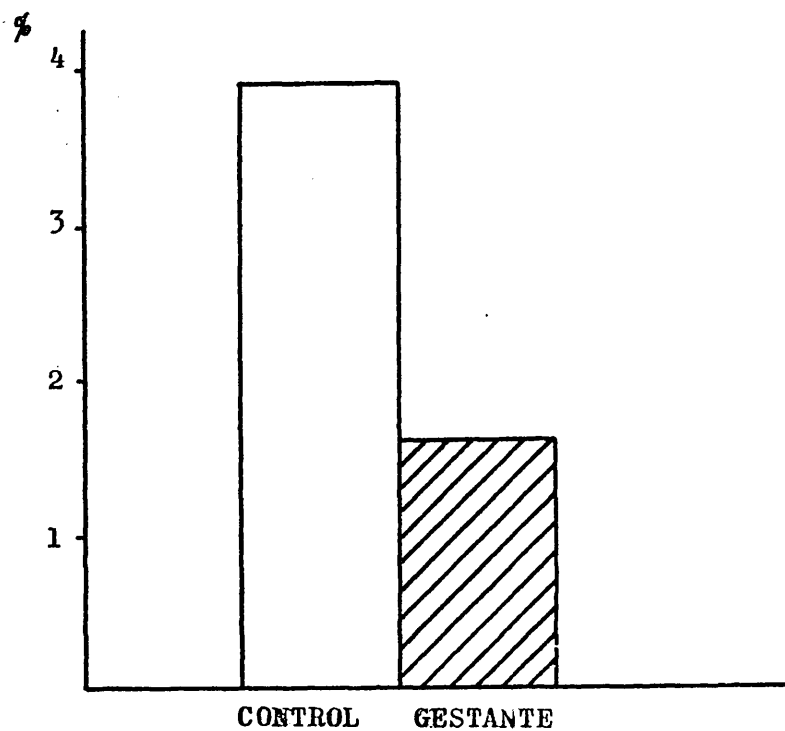


Figura 16.- Experiencias "in vivo". Representa el porcentaje de (1-<sup>14</sup>C)-acetato utilizado por el hígado durante los 5 minutos siguientes a la inyección intravenosa de dicho sustrato.

ses de lípidos más abundantes. En el hígado control, la mayor incorporación correspondió a triglicéridos, siguiendo - fosfolípidos, ácidos grasos libres y colesterol; las demás fracciones lipídicas no incorporaron cantidades significativas de (1-<sup>14</sup>C) acetato (fig. 15). En el hígado de la rata gestante, la incorporación de acetato fué menor, como ya dijimos anteriormente, y por consiguiente, los valores de radiactividad que presentan las diferentes fracciones están notablemente disminuidos, si bien los fosfolípidos y triglicéridos son los que muestran primacía frente a colesterol y ácidos grasos libres.

Estos datos obtenidos en los experimentos "in vivo" son de gran interés para enjuiciar en un sentido más amplio la dinámica del metabolismo lipídico hepático en la - gestación y nuestra línea de investigación sigue abierta en este sentido.

Es importante considerar que los resultados "in vivo" del metabolismo hepático son influenciados por procesos que ocurren en otros órganos sin olvidar además, en el animal gestante, el continuo paso de diferentes compuestos de la madre al feto a través de la barrera placentaria.

JONES (1974) observa que a los 5 minutos de inyectar a la cobaya gestante (1-<sup>14</sup>C) palmitato los fetos presentan una marcada incorporación en los lípidos hepáticos a diferencia de la presentada por los lípidos totales de tejido adiposo, riñón, cerebro y pulmón.

Recientes estudios "in vivo", realizados por EL PHICK y HULL (1977), sobre metabolismo lipídico en hígado y placenta de feto de coneja en el 28º día de desarrollo (período de gestación 31 días) ponen de manifiesto que el hígado

do fetal es más activo en la esterificación de ácidos grasos a fosfolípidos y triglicéridos cuando se compara con la placenta.

Por último y de acuerdo con lo expuesto hasta ahora, consideraremos una visión del problema estudiado en base a la literatura más recientemente descrita:

En la gestación la madre tiene que afrontar las necesidades que implican el desarrollo, diferenciación y crecimiento ininterrumpido del feto. Desde el punto de vista metabólico el feto se encuentra en un continuo anabolismo. Esto significa que existe una preponderancia de la síntesis y depósitos de componentes tisulares sobre la degradación de los mismos (HERRERA 1978).

Aunque no se conoce cuantitativamente el porcentaje relativo de compuestos que pasan de la madre al feto, ya que ésto varía en función de la situación metabólica de aquella, está bien establecido que atraviesan la barrera placentaria moléculas de glucosa, aminoácidos, cuerpos cetónicos, etc. por el contrario la atraviesan mal las moléculas de gran tamaño como las proteínas, polisacáridos, triglicéridos y ácidos grasos.

La primera pregunta que surge sobre lo expuesto anteriormente es cómo puede soportar la madre esta continua extracción de sustancias nutritivas, para soportar el continuo crecimiento fetal y para mantener a la vez su propia supervivencia.

Los primeros trabajos de HERRERA sobre el tema estuvieron dedicados a determinar niveles circulantes de metabolitos fundamentales en la sangre de la rata en el día 19 de gestación, comparándolos con los encontrados en ani-

males vírgenes de igual edad y sexo utilizados como controles. Los resultados obtenidos muestran que aparecen disminuidos los niveles circulantes de glucosa (hecho que está de acuerdo con las observaciones de BOURNE en 1975) y cuerpos cetónicos con relación a lo que se observa en animales control; los lípidos circulantes, triglicéridos y ácidos grasos libres, sin embargo, aparecen aumentados en la rata gestante (igualmente corroborado por BOURNE en 1975; KNOPP, y col. en 1975 y ACEBALY col. en 1973), en parte debido a que estos compuestos lipídicos atraviesan mal la placenta, por lo que la succión de ellos por el feto es baja.

La hiperlipemia de la gestación es un hecho observado en numerosas especies, si bien, como ya se indicó en la introducción, para otras es contradictorio. La rata desarrolla hiperlipemia durante la gestación (SCOW y col., 1964), si bien, la lipemia decrece rápidamente sobre el final del día 20. Dicha hiperlipemia es, a su vez, una de las principales causas de los trastornos metabólicos que se presentan en la madre.

Independientemente de la dificultad de los lípidos en cruzar la placenta, su aumento en la sangre materna podría estar influido por un aumento en la síntesis de los mismos, o por una aumentada llegada de ellos a la sangre procedente de las reservas endógenas de la madre. Puesto que el tejido adiposo es el que más eficazmente se ha diferenciado para el acúmulo y movilización de lípidos, HERRERA y col., estudiaron el metabolismo y sus respectivos controles, y pudieron demostrar que los procesos de lipogénesis, glicerogénesis, lipólisis y reesterificación están notablemente aumentados en la rata gestante.

Esta hiperactividad del tejido adiposo materno - explica la predisposición a la obesidad durante la gestación, pero no justifica la hiperlipemia, ya que la mayor libera-

ción de lípidos del tejido adiposo a la sangre (lipólisis aumentada) es compensada por las intensas lipogénesis, glicerogénesis y reesterificación, permitiendo a la madre un balance positivo hacia la conservación de grasa más que a su liberación. De hecho, durante la gestación aumenta incluso la masa de tejido adiposo de la madre, lo que permite mantener una abundante reserva metabólica endógena para situaciones de restricción alimenticia, asegurando así su supervivencia a pesar del continuo drenaje fetal.

La hiperlipemia de la gestación podría, sin embargo, estar influida por una disminución de la captación y metabolización de los glicéridos de la sangre por los distintos tejidos. Los glicéricos, como es sabido, al ser insolubles en medios acuosos, circulan bajo la forma de lipoproteínas que son sintetizadas preferentemente por el hígado. Las lipoproteínas circulantes llegan a través de la sangre a los distintos tejidos del organismo donde existe una enzima, la lipoproteína lipasa, que es especialmente activa en el hígado y en el tejido adiposo. Esta enzima cataliza la degradación de las lipoproteínas; de manera específica facilita la hidrólisis de glicéridos en glicerol y ácidos grasos libres que son captados y metabolizados o acumulados en los correspondientes tejidos. En caso de una disminuida actividad de la lipoproteína-lipasa, los glicéridos no pueden ser hidrolizados y captados, lo que produce un aumento de su concentración en sangre.

Ante la posibilidad de que la hiperlipemia de la gestación pudiera también estar influida por una alteración en la actividad de la lipoproteína-lipasa, condujo a HERRERA y col. a realizar un análisis cuantitativo de la misma en ratas gestantes y controles.

Después de inyectar lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) marcadas en sus triglicéridos con  $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$ , a los dos grupos de animales, observaron que la desaparición de las mismas en ratas preñadas era considerablemente más lenta que la de la sangre de las ratas controles. - Estos resultados concordaban con una menor incorporación de  $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$  en los lípidos de los distintos tejidos de la madre (hígado, tejido adiposo, corazón, etc.).

Estos resultados condujeron a pensar que en la - gestación no sólo está aumentada la síntesis y movilización, sino que la incorporación y metabolización de los lípidos - circulantes en sangre está disminuida en los distintos teji dos maternos.

Como ya se expuso en la introducción, WILLIAMS (1976) apunta que todavía no se ha puesto de manifiesto si en el embarazo humano, la hiperlipemia es el resultados de un aumento de la producción de lipoproteínas o de un catabo lismo defectivo.

Por consiguiente, y apoyándonos en los datos des critos en la literatura dedicada al tema objeto de esta memoria, pensamos que nuestros resultados puedan estar en la línea de las investigaciones expuestas anteriormente.

Como pusimos de manifiesto, el hígado de la rata gestante utiliza cerca de un 50% menos de (1- $^{14}\text{C}$ ) acetato que el de la control para los dos tipos de experiencias con -  $10\mu\text{Ci}$  y  $1\text{mCi}$  de dicho sustrato. Este hecho se repite en las experiencias "in vivo" a los 5 minutos de inyectar  $10\mu\text{Ci}$  de (1- $^{14}\text{C}$ ) acetato.

Por consiguiente, el (1- $^{14}\text{C}$ ) acetato, como conse-



cuencia de su activación inicial y subsiguiente utilización de la acetil-CoA por los complejos enzimáticos acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa, que actúan de modo secuencial, originará en un principio, ácidos grasos libres - que entrarán, inmediatamente, a formar parte de las diferentes fracciones lipídicas, segregadas al plasma bajo la forma de lipoproteínas. Este comportamiento metabólico del hígado de la rata gestante observado en nuestro trabajo puede estar de acuerdo con el hecho mencionado de que la hiperlipemia de la gestación podría estar influida por una disminución de la captación y metabolización de los glicéridos de la sangre por los distintos tejidos.

ACEBALy col. (1973), apuntan que en el hígado de la coneja gestante está disminuida la actividad de la acetil-CoA carboxilasa. Esta observación, unida al hecho ya mencionado de la alteración de la actividad de la lipoproteína lipasa en los diferentes tejidos de la rata gestante, nos conducen a pensar que, en primer lugar, la lipogénesis hepática está disminuida, como lo demuestran nuestros resultados, y por otro, que la metabolización de las lipoproteínas sintetizadas igualmente está disminuida al disminuir la actividad de la lipoproteína lipasa hepática, con lo cual los glicéridos no pueden ser eficientemente hidrolizados y captados de nuevo predominando, por consiguiente, la ventilación más o menos parcial de metabolitos intermediarios.

Esta observación concuerda con el hecho de que - en las experiencias realizadas con 1 mCi de (1-<sup>14</sup>C) acetato en el grupo control, la fracción de FFA circulantes presenta una actividad superior al resto de las fracciones (como resultado de los fenómenos de síntesis e hidrólisis de otras fracciones), por el contrario, en la rata gestante cambia - este esquema, siendo la fracción circulante prioritaria la - de fosfolípidos a la que habría que atribuir un cierto origen

a partir de metabolitos intermediarios de la hidrolisis de tri  
glicéridos. Por otro lado, el hígado sometido al estado fisio  
lógico de la gestación puede verse obligado a sintetizar com  
puestos necesarios para reponer estructuras, dada la particii  
pación de dicha fracción lipídica en la composición de mem-  
branas.

#### IV.- CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudia el metabolismo lipídico hepático en ratas gestantes, centrado en los siguientes puntos:

- Comparación en ratas gestantes y no gestantes, de la biosíntesis de las distintas fracciones lipídicas hepáticas, utilizando como precursor ( $1-^{14}\text{C}$ ) acetato.
- Experiencias con hígado perfundido, trabajando con dos cantidades diferentes de sustrato: 10 Ci y 1mCi de ( $1-^{14}\text{C}$ ) acetato.
- Estudio de la biosíntesis de las fracciones lipídicas (fosfolípidos, diglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos y ésteres - de colesterol) mediante su determinación en el medio de perfusión a lo largo de la experiencia como en el hígado al final de la misma.
- Estudio de la composición de los ácidos grasos en lípidos totales del hígado y modificaciones producidas por la gestación.
- Experiencias "in vivo". Administración intravenosa de 10  $\mu\text{Ci}$  de ( $1-^{14}\text{C}$ ) acetato a ratas gestantes y no gestantes.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se deducen las conclusiones que a continuación se resumen:

- 1.- No existen diferencias significativas en la cantidad de lípidos totales hepáticos en la rata gestante y en la - no gestante.
- 2.- La concentración de lípidos totales en el medio de perfusión es ligeramente superior en las ratas gestantes - que en las controles, y los valores de aquéllas, a diferencia de los presentados por las ratas control, no experimentan cambios significativos a lo largo del tiempo.
- 3.- La utilización de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato para la síntesis de lípidos en hígado perfundido con  $10\mu\text{Ci}$  fué aproximadamente un 50% menor en ratas gestantes que en las no gestantes; este mismo hecho se observó en las experiencias con  $1\text{mCi}$ . En las experiencias "in vivo", a los 5 minutos de una inyección intravenosa de  $10\mu\text{Ci}$  del precursor, se observa - de nuevo que los lípidos hepáticos de las ratas gestantes incorporan casi la mitad de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato que los de - las ratas no gestantes.
- 4.- La incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato a las diferentes fracciones lipídicas circulantes es distinta y varía en función del tiempo:
  - Fosfolípidos. - En las experiencias con  $10\mu\text{Ci}$ , las ratas control presentan una incorporación gradual ascendente en función del tiempo, mientras que en las gestantes, esta fracción presenta valores superiores y más constantes, si bien, en este grupo, los datos individuales mostraron una enorme variabilidad que nos impide toda generalización. Las experiencias con  $1\text{mCi}$  - muestran que la radiactividad de dicha fracción en las ratas gestantes es casi 4 veces superior (a los 5 minutos) que en las controles. Los valores relativos para esta fracción en las ratas gestantes son superiores a los de las demás fracciones y decaen en función del -

tiempo; ésto no ocurre en el lote control.

No se observan diferencias significativas, entre las muestras de medio de perfusión, de entrada al hígado y de salida del mismo, excepto para ratas gestantes (con 1mCi), en que al minuto 50 para esta fracción presentan un valor de radiactividad notablemente superior en entradas que en salidas.

- Colesterol. En las experiencias de  $10\mu\text{Ci}$ , el colesterol circulante ocupa una posición importante en el grupo de ratas control; pero no así en el de gestantes. - Por el contrario, dicha fracción presenta una marcada incorporación en ambos grupos, en las experiencias de 1mCi, siendo ésta menor en las ratas gestantes.
- Ácidos grasos libres. En las experiencias de  $10\mu\text{Ci}$  los valores de incorporación para esta fracción son pequeños y aumentan ligeramente en función del tiempo; en las experiencias de 1mCi en los animales control el valor de esta fracción a los 5 minutos es muy superior al resto de las fracciones y este valor aumenta considerablemente a lo largo del tiempo; por el contrario no ocurre así en gestantes y este valor pierde la primacía a los 5 minutos.

El valor relativo para ácidos grasos libres en las ratas control decae desde un 70% aproximadamente hasta un 25%; sin embargo en las gestantes esta caída no es tan espectacular.

- Triglicéridos. Es la fracción que presenta con mayor notoriedad un aumento de incorporación en función del tiempo en los dos grupos de experimentos, pues en las ratas control de  $10\mu\text{Ci}$  el valor final de triglicéridos

queda aumentado en unas 5 veces su valor inicial, mientras que en las ratas control de 1mCi se llega a alcanzar una cifra 1000 veces superior. En gestantes también se observa este aumento. Los valores relativos para esta fracción igualmente aumentan en función del tiempo.

Las ratas gestantes correspondientes al lote de 1mCi presentan diferencias entre los valores de radiactividad de las muestras (E) y (S) en el minuto 50, es decir, en este tiempo el nivel de incorporación a la entrada es 3-4 veces superior al que presenta esta fracción en la sangre a la salida del hígado, (recuérdese que es lo contrario que ocurrió en fosfolípidos).

- Esteres de colesterol. En ninguno de los ensayos de perfusión se ha detectado incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato a esta fracción en los lípidos circulantes a lo largo de toda la experiencia.

5.- La incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato a las fracciones lipídicas hepáticas se puede resumir de la siguiente manera:

Experiencias con 10 $\mu$ Ci.- En las ratas control las fracciones hepáticas que presentaron mayor actividad correspondieron a colesterol, triglicéridos y fosfolípidos mientras que en las ratas gestantes fueron para triglicéridos y fosfolípidos mostrando valores inferiores a los de las primeras.

Experiencias con 1mCi.- La fracción que presenta mayor incorporación es la de colesterol seguida por triglicéridos y fosfolípidos; la menor corresponde a ésteres de colesterol. Esto se observa igualmente para controles que para gestantes, si bien los valores en estas últimas son

inferiores (dado que el acetato total incorporado también fué menor).

Los valores relativos que presentaron las fracciones lipídicas hepáticas son muy similares en las ratas gestantes y en controles y puesto que la fijación de radiactividad en las primeras es aproximadamente la mitad que en estas últimas, podría deducirse que los coeficientes de recambio en gestantes son menores.

- 6.- La composición de ácidos grasos en lípidos totales de hígado parece indicar que en gestantes es superior el porcentaje de ácido palmítico a la vez que desciende el de esteárico, con respecto a los ácidos grasos insaturados las gestantes muestran porcentajes superiores para los ácidos 24:1 y 22:6.
- 7.- El porcentaje de incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetato a los ácidos grasos de los lípidos hepáticos mostró que en animales gestantes es superior para el ácido esteárico, mientras que el del mirístico y palmítico disminuyen con respecto a las ratas controles. Son también superiores en gestantes los porcentajes para los ácidos grasos insaturados palmitoleico y oleico.
- 8.- El grado de insaturación en los lípidos hepáticos es mayor en ratas gestantes que en las control, creemos que este hecho puede estar relacionado con que en las primeras, la fracción de fosfolípidos circulantes mantenga desde los 5 minutos de añadir el sustrato valores de radiactividad superiores a los de las demás fracciones, dado que dicha fracción es responsable de una mayor insaturación.



9.- En las experiencias "in vivo" la incorporación de (1-<sup>14</sup>C) acetato a lípidos hepáticos fué menor en gestantes (casi un 50%) que en las ratas controles. Los valores que presentaron las fracciones lipídicas tanto en controles como en gestantes, fueron superiores para triglicéridos y fosfolípidos siguiendo colesterol y ácidos grasos libres si bien en las gestantes estos valores fueron inferiores.

## V. BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- ACEBAL, C.; ARCHE, R.; CASTRO J.; MUNICIO, A.M.;  
(1973). Steroids Lipids Res. 4, 310.
- 2.- ACEBAL, C.; ARCHE, R.; CASTRO, J.; MUNICIO, A.M.;  
(1973).- Steroids Lipids Res. 4, 323.
- 3.- ADAM, P.A.J.; TERRANO, K.; RAIHA, N.; (1968). Proc.  
78th Annual Meeting of American Pediatric.
- 4.- ALEXANDER, D.P.; BRITTON, H.G.; (1968a). Foetal Anton  
Ciba Found. Symp., 95;
- 5.- ALEXANDER, D.P.; BRITON, H.G.; (1968b). J.Physiol.,  
London 196, 27 p.
- 6.- ALLMAN, D.W.; HUBBARD, D.D.; GIBSON, D.M. (1965).  
J. Lipid Res. 6, 63.
- 7.- ALLRED, J.B.; ROEHRIG, K.L., (1973). J. Biol. Chem.  
248, 4131.
- 8.- ANANDA, RAO, G.; SORRELS, M.F.; REISER (1971). Lipids  
Vol. 6, 2, 88.
- 9.- ASSMAN, G.; KRAUSS, R.M.; FREDRICKSON, D.S.; LEVY, R.  
I.; (1973). Biol. Chem. 248, 1992.
- 10.- BALLARD, F.J.; HANSON, R.W., (1967). Biochem. J. 102,  
952.
- 11.- BARNES, C. G. (1965). En "Medical Disorders in Obster  
tric Practice". Ed. Blackwell. Oxford.

- 12.- BAR-ON, H.; KCOL, A.I.; STEIN, O.; STEIN, Y; (1973).  
Biochim. Biophys. Acta 306, 106.
- 13.- BASSET, J.; (1971). J. Endocrinology 50, 59
- 14.- BAUTOVICH, G.J.; SIMONS, J.A.; TURTLE, J.R.; WILLIAMS  
P.F.; (1975). Atherosclerosis 21, 217.
- 15.- BECK, P.; PARKER, M.L. and DAUGHADAY, W.H. (1965).  
J. Clin. Endocr. and Metab. 25, 1457.
- 16.- BECK and DAUGHADAY, W.H. (1967). J. Clin. Invest. 46,  
103.
- 17.- BECK, P.; WELLS, S.A. (1969). J. Clin. Endocr. 29,  
807.
- 18.- BENGTSSON, J.P., EJARKE, P.M.; (1964). Acta. Obstet.  
Gynec. Scand. 43, 49.
- 19.- BERGMAN, E.M.; SELLERS, A.F. (1960). Amer. J. Physiol.  
198, 1083.
- 20.- BERGHER, E., KAUNITZ, H.; JOSEPH, J., (1964).  
Obst. Gyn. 24, 909.
- 21.- BEWSHER, P.D.; TARRANT, M.E.; ASHMORE, J. (1966)  
Diabetes 15, 346.
- 22.- BLIG, E.G.; DYER, W.J. (1959). Can. J. Biochem.  
Physiol. 39, 911.
- 23.- BLOCH, K.; (1969). Accounts Chem. Res. 2, 193.

- 24.- BLOOMFIELD, D.K.; BLOCH, K.; (1960). J. Biol. Chem. 235, 337.
- 25.- BLUM, C.B.; LEVY, R.I.; (1975). Ann. Rev. Medicine 26, 365.
- 26.- BOHMER, T.; HAVEL, R.; LONG, J.A.; (1972). J. Lipid Res. 13, 371.
- 27.- BORTZ, W.M.; LINEN, F. (1963). Biochem. Z. 56, 658.
- 28.- BOURNE, A.R., D.P. RICHARDSON, K.R., BRUCKDORFER, YUOKIN, J. (1975) Nutr. Metabol 19, 73.
- 29.- BRENNER, R.R.; (1971). Lipids 6, 567.
- 30.- BRESSLER, R. (1970). S.J. Wakil (ed.) Lipid Metabolism, p. 49. Academic Press. New York.
- 31.- BRICKER, L.A., LEVEY, G.S. (1972). J. Biol. Chem. 247, 4914.
- 32.- BROCK, D.J.H.; KASS, L.R.; BLOCH, K.; (1967). J. Biol. Chem. 242, 4432.
- 33.- BRO-RASMUSSEN., BUUS, O.; LUNDWALL, F. (1962). Acta Endocr. 40, 571.
- 34.- BRUNENGRABER, H.; BOUTRY, M.; LOWENSTEIN, J.M.; (1973), J. Biol. Chem. 248, 2656.
- 35.- BURT, R.L. (1960). Obstet. Gynecol. 15, 460.
- 36.- BURTON, D.N.; COLLINS, J.M.; KENNAN, A.L.; PORTER, J.W.; (1969) J. Biol. Chem. 244, 4510.

- 37.- BUTCHER, R.; HO, J.; MUNG, H.; SUTHERLAND, E. (1965)  
J. Biol. Chem. 240, 4515.
- 38.- BUTCHER, R.; SNEYD, J.; PARK, C.; SUTHERLAND, E.;  
(1966). J. Biol. Chem. 241, 1651.
- 39.- BUTCHER, R.; SUTHERLAND, E.; (1967). Ann. New York.  
Acad. Sci. 139, 849.
- 40.- CAMPBELL, R.M.; KOSTERLITZ, N.Y., (1949). J. Endo-  
crinol, 6, 171.
- 41.- CATT, K.J.; MOFFAT, B.; NIALL, H.D.; (1967). Science  
157, 321.
- 42.- CAVALLI, D.; (1965). Quan. Clin. Ost. Gin. 20, 427.
- 43.- CHANG, H.C.; SEIDMAN, I.; TEEBOR, G.; LANE, M.D.;  
(1967). Biophys. Res. Commun. 28, 682.
- 44.- CHAPMAN, M.J.; MILLS, G.L.; TAYLAUR, C.E.; (1973).  
Biochem. J. 131, 177.
- 45.- CHERNICK, S.S.; CHAIKOFF, L.L.; (1950). J. Biol.  
Chem. 186, 535.
- 46.- CHU, L.C.; Mc INTOSH, D.J.; HINCENBERGS, I.; WILLIAMS  
M.A.; (1969). Biochim. Biophys. Acta 187, 573.
- 47.- CONNER, W.R.; LIM, D.S.; (1967). J. Lipid Res. 8,  
558.
- 48.- CSORBA, T.R.; MATSUDA, I.; KALANT, N.; (1966). Me-  
tab. Clin. Exptl. 15, 262.

- 49.- CURRY, D.; BENNETT, L. y GRODSKY, D. (1968)  
Endocrinology, 83, 572.
- 50.- DAAE, L.; BREMER, J. (1970). Biochem. Biophys. Acta  
210, 92.
- 51.- DAAE, L.N.W.; (1972 a). Biochim. Biophys. Acta, 270, 23
- 52.- DAAE, L.N.W.; (1972 b). Feba Lett. 27, 46.
- 53.- DAAE, L.N.W. (1973). Biochim. Biophys. Acta 306, 186.
- 54.- DANNENBURG, W.N.; BURT, R.L.; LEAKE, N.H. (1964).  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 115, 504.
- 55.- DANNENBURG, W.N.; BURT, R.L. (1965). Amer. J. Obst.  
Gyn. 92, 195.
- 56.- DEGRELLE-CHEIMOL, C.L. (1970). Rev. Eur. Etud. Clin.  
Biol. 15, 1072.
- 57.- DESSAUER, H.C. (1955). J. Exp. Zool. 128: 1
- 58.- DODDS, P.F.; BRINDLEY, D.N.; GURR, M.I. (1976)  
Biochem. J. 160, 701.
- 59.- DOLE, V.P.; MEINERTZ, H.; (1960). J. Biol. Chem.  
235, 2595.
- 60.- DOLE, V.P. (1965). Handbook of physiology. Section  
5, Adipose tissue, p. 13. Williams y Wilkins, Baltimore.
- 61.- DORSEY, J.A.; PORTER, J.W.; (1968). J. Biol. Chem.  
243, 3512.

- 62.- EGWIN, P.O.; SGOUTAS, D.S. (1972). Amer. J. Clin. Nutr.  
25, 16.
- 63.- EISENBERG, S.; RACHMILEWITZ, D. (1973). Biochim.  
Biophys. Acta 326, 378.
- 64.- ELPHICK, M.L.; HUDSON, D.G.; HULL, D.; (1975).  
J. Physiol. (London), 252, 29.
- 65.- ENDO, K.; HELMKAMP, G.M.; BLOCH, K.; (1970).  
J. Biol. Chim. 245, 4293.
- 66.- EVELYN, K.A.; MALLOY, H.T. (1938). J. Biol. Chem.  
126, 655.
- 67.- FABIAN, E.; STORK, A.; KUCEROVA, L.; (1968).  
Amer. J. Obst. Gyn. 100, 904.
- 68.- FAIN, J.N.; SCOW, R.O. (1966). Am. J. Physiol.  
210, 19.
- 69.- FAIN, J.; SIPERSTEIN, R.; (1970). En "Adipose Tissue"  
p. 20, ed. Academic Press. New York.
- 70.- FAIN, J.; ROSENBERG, L. (1972). Diabetes 21, 414.
- 71.- FAIRWEATHER, D.V.I.; (1971). J. Obst. Gyn. Brit.  
Com. 78, 707.
- 72.- BLEICHER, S.; MOLDAU, J.; SCHERRER, J.; GOLDNER, M.G.  
(1964). Metabolism. 13, 583.
- 73.- FLORINI, J.R.; TONELLI, G.; BREVER, C.B.; COPPOLA, J.  
RINGLER, I.; BELL, P.A.; (1966). Endocrinol. 79, 692.
- 74.- FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G.H.S. (1957), J. Biol.  
Chem. 226, 497.



- 75.- FREDRICKSON, D.; GORDON, R. (1958). Physiology Rev. 38, 585.
- 76.- FREINKEL, N. (1964). Diabetes 13, 260.
- 77.- FREINKEL, N.; (1965) B.S. Leibel y G.A. Wrenshall (eds.). Excerpts Medics Foundation, New York.
- 78.- FRIESEN, H.; (1965). Endocrinology 76, 369.
- 79.- FRITZ, I. (1961). Physiol. Rev. 41, 52.
- 80.- FURMAN, R.H.; ALAUPOVIC, P.; HOWARD, R.P.; (1967). Prog. Biochem. Pharm. 2, 215.
- 81.- FURMAN, R.M.; ALAUPOVIC, P.; BRADFORD, R.H.; HOWARD, R.P. (1968). Prog. Biochem. Pharmacol, 4, 334.
- 82.- GAUTRAY, J.P.; (1968). En "Reproduction humaine". Ed. Masson. París.
- 83.- GAYLOR, J.L.; MORR, N.J.; SUFRIED, H.E.; HEFCOATE, C.R.E. (1970). J. Biol. Chem. 245, 5511.
- 84.- GEMZELL, C.A.; FILTEJKERSKJOLD, F.; STROM, L. (1955) J. Clin. Endocr. Metab. 15, 537.
- 85.- GERSHBERG, H.; JAVIER, Z. and HULSE, M. (1964). Diabetes 13, 378.
- 86.- GONÇALVES, J.; FAVARGER, P.; ROUS, S. (1972). Biochimie 54, 1049.

- 87.- GRODSKY, G.; BATTS, A.; BENNET, L.; VAELLA, C.; Mc WILLIAMS, N.; SMITH, D. (1963). Amer.J. Physiol. 205, 638.
- 88.- GRUMBACH, M.M.; KAPLAN, S.L.; ABRAMS, C.L.; BELL, J.J. and CONTE, E.A. (1966). J. Clin. Endocr. 26, 478.
- 89.- GRUMBACH, M.M.; KAPLAN, S.L.; SCIARRA, J.J. and BURR, I.M. (1968). Ann. New York Acad. Sci. 148, 501.
- 90.- HAFT, D.E.; (1967), Am. J. Physiol. 213, 219.
- 91.- HALES, C.; RANDLE, P.; (1963). Landet 200.
- 92.- HAMILTON, R.L.; WILLIAMS, M.C.; FIELDING, C.J.; HAVEL, R.J. (1976) J. Clin. Invest. 58, 667.
- 93.- HAVEL, J.; FREDRICKSON, S. (1956). J. Clin. Invest. 35, 1025.
- 94.- HELMKAMP, G.M.; BROCK, D.J.H.; BLOCH, K.; (1968) J. Biol. Chem. 243, 3229.
- 95.- HEMS, R.; ROSS, S.D.; BERRY, M.N.; KREBS, H.A. (1966) Biochem. J. 101, 284.
- 96.- HERRERA, E.; KNOPP, R.M.; FREINKEL, N. (1969). J. Clin. Invest. 48, 3260.
- 97.- HERRERA, E. (1978). Investigación y Ciencia. Abril, p. 14.
- 98.- HILLMAN, J.; SCHONFELD, G.; MILLER, J.P.; WULFF, G.; (1975). Metabolism 24, 943.

- 99.- HOLLOWAY, P.W.; PELUFFO, R.O.; WAKIL, S.J. (1963)  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 300.
- 100.- HOLLOWAY, P.W.; WAKIL, S.J.; (1970).  
J. Biol. Chem. 245, 1862.
- 101.- HOWARD, C.F. Jr., LOWENSTEIN, J.M. (1965).  
J. Biol. Chem. 240, 4170.
- 102.- HULL, D. (1975). Br. Med. Bull. 31, 32.
- 103.- ISRAEL, S.L.; STROUP, P.E.; SELIGSON, H.T. (1959).  
Obst. Gyn. 14, 68.
- 104.- IVERSON, J. (1971). J. Clin. Invest. 50, 2123.
- 105.- JACKSON, R.L.; MORRISETT, J.D.; GOTTO, A.M.; (1976)  
Physiol. Rev. 56, 259.
- 106.- JAMES, A.T.; (1968). Chem. Brit. 4, 484.
- 107.- JANSEN, G.R.; ZANETTI, M.E.; HUTCHISON, C.F. (1967)  
Biochem. J. 102, 870.
- 108.- JONAS, R.E.S.; BILLINSKI, E. (1964). J. Fish. Res.  
Bd. Can. 21, 653.
- 109.- JONES, C.T. (1973) En "Feotal and Neonatal Physiology" (Comline, K. S.; Cross, K.W.; Dawes, G.S. and Nathanielsz, P.W., eds.). p. 403. Cambridge University Press, Cambridge.

- 110.- JONES, C.T. (1976) J. Reprod. Fertil, 47, 189.
- 111.- JONES, C.T., ASHTON, L.K. (1976 a). Biochem. J. 154, 149.
- 112.- JONES, C.T.; FIRMIN, W. (1976). Biochem. J. 154, 159.
- 113.- JONES, C.T. (1976) Biochem. J. 156, 357.
- 114.- JOSIMOVICH, J.B. and McLAREN, J.A. (1962).  
Endocrinology 71, 209
- 115.- JOSIMOVICH, J.B.; ATWOOD, B.G.; GOSS, D.A. (1963)  
Endocrinology, 73, 410.
- 116.- KALKHOFF, R.; SCHALCH, D.S.; WALKER, J.L.; BECK,  
P.; KIPNIS, D.; (1964) Trans. Ass. Am. Physns. 77:  
270.
- 117.- KALKHOFF, R.K.; KIN, H. and STODDARD, F.J. (1968)  
Programme of the 28th Annual Meeting of the American  
Diabetes Association, San Francisco, California.
- 118.- KANOCH, H.; SINCLAIR, (1973 a). Biochim. Biophys.  
Acta 306, 203.
- 119.- KANOCH, H.; OHNO, K. (1973 b). Biochim. Biophys.  
Acta 326, 17.
- 120.- KAPLAN, S.L.; GRUMBACH, M.M. (1964), J. Clin.  
Endocr. and Metab. 24, 80.

- 121.- KASS, L.R.; BROCK, D.J.H.; BLOCH, K., (1967).  
J. Biol. Chem. 242, 4418.
- 122.- KATZ, J.; LANDAU, B.R.; BARTSCH, G.E. (1966)  
J. Biol. Chem. 241, 727.
- 123.- KENNEDY, E.P. (1961). Fed. Proc., 20, 934.
- 124.- KHOO, J.C.; STEINBERG, D.; THOMPSON, B.; MAYER, S.E.  
(1973). J. Biol. Chem. 248, 3823.
- 125.- KHOO, J.C.; STEINBERG, D.; (1975) En J.M. Lowenstein  
(ed.). "Methods in enzymology" Vol. XXXV, Lipids.  
Part B, 181. Academic Press, New York.
- 126.- KLEVIT, H.D. (1966). Pediat.Clin.N.Amer. 13, 59.
- 127.- KORNACKER, M.S.; LOWENSTEIN, J.M. (1964). Science  
144, 1027.
- 128.- KNOPP, R.H.; HERRERA, E.; FREINKEL, N. (1970).  
J. Clin. Invest. 49, 1438.
- 129.- KNOPP, R.H.; SANDEK, C.D.; ARKY, R.A.; O'SULLIVAN,  
J.B.; (1973). Endocrinology 92, 984.
- 130.- KORNBERG, A.; PRICER, W.E.; (1953). J. Biol.Chem.  
204, 345.
- 131.- KRAUSS, R.M.; WINDMUELLER, H.G.; LEVY, R.I.; FRE-  
DRICKSON, D.S. (1973). J. Lipid. Res. 14, 286.

- 132.- KREBS, H.A.; HENSELEIT, K. (1968). Hoppe-Seyl. Z. 210, 33.
- 133.- KREBS, H.A. (1968) En "Stoffwrenchsel der isoliert perfundierten Leber". (W.Staib y R. Scholz eds.) p. 129. Springer-Verlag Berlin y New York
- 134.- KREBS, H.A.; WALLACE, P.G.; HEMS, R.; FREEDLAND, R.A. (1969) Biochem. J. 112, 595.
- 135.- KUMARESAN y TURNER (1968). En "Human Reproductive physiology", p. 533, Ed. Roney P. Shearman.
- 136.- LANDAU, R.L. and LUGIBIHL, K. (1961). Rec. Prog. Horm. Res. 17, 249.
- 137.- LANDAU, R.L. and LUGIBIHL, K. (1967) Metabolism 16, 1114.
- 138.- LANGDON, R.G., (1957) . J. Biol. Chem. 226, 615.
- 139.- LANMAN, J.T. (1961). Pediatrics 27, 150.
- 140.- LARON, Z.; MANNHEIMER, S.; NITZAN, M. (1967). Arch. Dis. Child. 42, 24.
- 141.- LA ROSA, J.C.; LEVY, R.I.; WINDMVELLER, H.G.; FREDRICKSON, D.S. (1972). J. Lipid Res. 13, 356.
- 142.- LAWRENCE, A. (1966). Proc.Nat.Acad.Sci., 55, 316
- 143.- LEFEBVRE, P. (1966). Diabetologia 2, 130.
- 144.- LEFEBVRE, P., LUYKC, A. (1969) Diabetologia 5, 195

- 145.- LEFEBVRE, P. (1975). Biochem. Pharmacol. 24, 1261.
- 146.- LEHNINGER, A.L. (1975). Biochemistry. Worth Publishers, New York.
- 147.- LEONE, V.; LEONARDIS DE A.; PIERRO DI, A.; (1958) Min. Gin. 10, 276.
- 148.- LIND, T.; BILLEWIZ, W.Z.; (1973). J. Obst. Gyn. Brit. Com., 80, 1033.
- 149.- LO, C.; MARSH, J.B.; (1970), J. Biol. Chem. 5001.
- 150.- LOTEN, E.G.; SNEYD, J.G.T. (1970) Biochem. J. 120, 307.
- 151.- LOWENSTEIN, J.M. (Ed.). (1969). Methods in enzymology, Vol. XIV, Lipids. Academic Press, New York.
- 152.- LOWENSTEIN, J.M. (Ed.). (1975) Methods in enzymology, Vol. XXXV, Lipids., Part. B. Academic Press, New York.
- 153.- LOWENSTEIN, J.M. (1971). J. Biol. Chem. 246, 629.
- 154.- LUIKC, A.; LEFEBVRE, P. (1970). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 524.
- 155.- LUNZER, M.A.; MANNING, A.; OCKNER, R.K. (1977). J. Biol. Chem. 252, 5483.
- 156.- LUST, G.; LYNEN, F.; (1968). Eur. J. Biochem. 7, 68
- 157.- LYNEN, F. (1961). Fedr. Proc. Feder. Am. Socs. Exp. Biol. 20, 941.

- 158.- LYNEN, F. (1967). Biochem. J. 102, 381.
- 159.- MAJERUS, P.W.; JACOBS, R.; SMITH, M.B.; MORRIS, H.P.  
(1968). J. Biol. Chem. 243, 3588.
- 160.- MAJERUS, P.W.; KILBURN, E.; (1969). J. Biol. Chem.  
244, 6254.
- 161.- MALAISSE, W.J.; MALAISSE LAGAE, F.; PICARD C. and  
PLAMENT DURAND J. (1969). Endocrinology 84, 41.
- 162.- MANGOLD, H.K.; MALINC, D.C. (1961). J. Am. Chem. Soc., 37, 383.
- 163.- MARGOLIS, S.; VAUGHAN, M.; (1962). J. Biol. Chem.  
237, 44.
- 164.- MARTIN, D.B.; VAGELOS, P.R. (1962), J. Biol. Chem.  
237, 1787.
- 165.- MARTIN, D.B.; VAGELOS, P.R. (1965). En "Handbook  
of Physiology". Section 5: adipose tissue. Baltimore.
- 166.- MARTIN, J.D.; MILLS, J.H. (1958) Clin. Sci., 17, 137.
- 167.- MAYES, P. (1970) En "Adipose Tissue" p. 186 Ed. Academic Press: New York.
- 168.- MCKAY, D.G.; KAUNITZ, H. (1963). Metab. Clin. Exp.  
12, 990.
- 169.- MEAD, J.F. (1961). Federation Proc. 20, 952.
- 170.- METCALFE, L.D.; SCHMITZ, A.A.; PELKA, J.R. (1966)  
Analyt. Chem. 38, 514.
- 171.- MILLER, L.L.; BLY, C.G.; WATSON, M.L.; BALE, W.F.  
(1951) J. Exp. Med. 94, 431.



- 172.- MOHRHAVER, H.; CHRISTIANSEN, K.; GAN, M.V.; DEUBIG, M.; HOLMAN, R.T. (1967). Biol. Chem. 242, 4507.
- 173.- MOOKERJEA, S.; (1969). Can. J. Biochem. 47, 125.
- 174.- MURPHY, B.E.P.; CLARKS, S.; (1974). Amer. J. Obst. Gyn. 118, 538.
- 175.- MILKOVIC, S.; MILKOVIC, K.; PAUNOVIC, J. (1973). Endocrinology 92, 380.
- 176.- MILKOVIC, S.; MILKOVIC, K.; SENCAR, I.; PAUNOVIC, J.; (1970) En "Progress in Brain Research", ed. por De Wid y Wijnen. Elsevier, Amsterdam, Vol, 32,p.71
- 177.- NAGAI, J.; BLOCH, K.; (1966) J.Biol.Chem. 241, 1925
- 178.- NAGAI, J.; BLOCH, K.; (1968) J. Biol.Chem. 243, 4626
- 179.- NAKANISHI, S.; NUMA, S.; (1970). Eur.J.Biochem. 16, 161
- 180.- NEHER, R. and STARK G. (1961) Experimentia 17, 510.
- 181.- NESTEL, P.G. (1967) Metab. Clin. Expt. 16, 1123.
- 182.- NEWSHOLME, E.A., START, C., (1973) en "Regulation in Metabolism". John Wiley and Sons London. New York. Sydney, Toronto.
- 183.- NOBLE, R.C.; STEELE, W.; MOORE, J.H. (1970) Journal of Dairy Research 37, 297
- 184.- NORUM, K.; FARSTAD, M.; BREMER, J.; (1966). Biochem. Biophys. Res.Comun. 24, 797.

- 185.- OSHINO, N.; IMAI, Y.; SATO, R.; (1966). Biochem. Biophys. Acta 128, 13.
- 186.- OSHINO, N.; IMAI, Y.; SATO, R.; (1971 a). J. Biochem. Japan 69, 155.
- 187.- OSHINO, N.; SATO, R.; (1971 b). J. Biochem. Japan 69, 169.
- 188.- OSHINO, N.; SATO, R.; (1972 a). Arch. Biochem. Biophys. 149, 369.
- 189.- OSHINO, N.; (1972 b). Arch. Biochem. Biophys. 149, 378.
- 190.- OSUGA, T.; PORTMAN, O.W.; (1971). Am. J. Physiol. 220, 735.
- 191.- OTWAY, S.; ROBINSON, D.S. (1968). Biochem.J. 106, 677.
- 192.- PEARLMAN, W.H.; CREPY, O.; MURPHY, M., (1967) J. Clin. Endocr. 27, 1012.
- 193.- PENHOS, J.C.; WU, C.H.; LEMBERG, A.; DAUNAS, J.; BRODOFF, B.; SODERO, A.; LEVINE, R.; (1968). Metab. Clin. Exptl. 17, 246.
- 194.- PERLEY, M.; KIPNIS, D.M. (1965) Clin.Res. 13, 331.
- 195.- PERLEY, M.; KIPNIS, D.M.; (1966) New Eng. y Med. 274 1237.
- 196.- PERLEY, M.; KIPNIS, D. (1967) J. Clin. Invest. 46, 1954
- 197.- PETERSON, R.R.; YOUNG, W.C.; (1952). Endocrinology, 50, 218.

- 198.- PICARD, C. (1967). Bull.Soc.Roy.Belge Gyn.Cbst.  
37, 277.
- 199.- POO, L.J.; LEW, W. and ADDIS, T. (1939) J. Biol.  
Chem. 128, 69.
- 200.- POPJAK, G., (1946) J. Physiol. 105, 236.
- 201.- POPJAK, G.; BECKMANS, (1950). Biochem. J. 547.
- 202.- POPJAK, G.; (1954). Cold Spring Harbor Sym. Quant.  
Biol. 19, 200.
- 203.- QUINTO, P.; BOTTIGLIONI, F.; ORLANDI, C.; (1964).  
En "Metabolismo glicídico e stato puerperale". Ed.  
Capelli, Bologna.
- 204.- RANDLE, P.J.; GARLAND, P.B.; NEWSHOLME, E.A., (1965)  
Ann. N.Y.Acad. Sci. 131, 324.
- 205.- RANDLE, P.J., (1966) Diabetologia 2, 237.
- 206.- RANDO, R.R.; BLOCH, K.; (1969). J. Biol. Chem. 243,  
5527.
- 207.- RENNER, R.; KEMMLER, W.; HEPP, K. (1974). Europ.  
J. Biochem. 105, 869.
- 208.- RIDDICK, F.A.; REISLER, D.M. and KIPNIS, D.M. (1962).  
Diabetes 11, 171.
- 209.- RIGGI y col., (1966). Citado por Tuttle, J.R. en  
"Human Reproductive physiology" p. 535. Ed. Rodney  
P. Shearman.
- 210.- ROBINSON, J.; BRADY, R.O.; BRADLEY, R.M. ; (1963)  
J. Lipid . Res. 4, 144.

- 211.- RODBELL, M. (1972) Glucagon: Molecular Physiology, Clinical and Therapeutic Implications p. 61. Ed. Pergamon Press: Oxford.
- 212.- ROSS, B.D.; HEMS, R.; KREBS, H.A. (1967) Biochem. J. 102, 942.
- 213.- ROUX, J.F. (1966). Metabolism 15, 856
- 214.- ROUX, J.F.; YOSHIOKA, T. (1970) Clin. Obstet. Gynecol. 13, 595.
- 215.- ROUX, J.F.; MYERS, R.E. (1974). Amer. J. Obst. Gyns 118, 385.
- 216.- RUBENSTEIN, B.; RUBENSTEIN, D. (1966). Can. J. Biochem. 44, 129.
- 217.- RUDERMAN, N.B.; RICHARDS, K.C.; VALLES DE BOURGES, V.; JONES, A.L. (1968) J. Lipids. Res. 9, 613.
- 218.- RYAN, K.J.; MEIGS, R. and PETRO, Z. (1966). Amer. J. Obstet. Gynec. 96, 676
- 219.- SANDBERG, A.A.; SLAUNWHITE, W.R.; (1965) J. Clin. Invest. 38, 1290.
- 220.- SCHOMI, M.; KAISER, D.; DRACK, E.; AXMACHER, U.; ELLIOTT, J.A. (1975). Eur.J.Clin.Invest. 5, 159
- 221.- SCOW, R.O.; CHERNICK, S.S. y BRINLEY, M.S. (1964) Amer.J. Physiol. 206, 796
- 222.- SCOW, R.O.; CHERNICK, S.S. (1970). J.Clin. Invest. 49, 1685.

- 223.- SEIDMAN, I.; HORLAND, A.A.; TEEBOR, G.W. (1967)  
Biochim. Biophys. Acta 146, 600.
- 224.- SCHIMASSEK, H. (1963) Biochem. Z. 336, 460.
- 225.- SIMON, J.B.; BOYER, J.L. (1971). Biochem. Biophys.  
Acta 218, 549.
- 226.- SIMS, R.P.A.; LAROSE, J.A.G. (1962). J. Am. Oil. Chem.  
Soc. 39, 232.
- 227.- SINCLAIR, A.J. (1974). Lipids 9, 809.
- 228.- SMITH, R.W.; WALSH, A.; (1975) Research in Veteri-  
nary Science 19, 230.
- 229.- SMITH, R.W.; WALSH, A. (1975). Lipid. Vol. 10, nº 10, 643.
- 230.- SOLER ARCILAGA, C.; INFANTE, R.; POLONCUSKI, J. (1975)  
Biomedicine 20, 154.
- 231.- SONG, C.S.; RIFKIND, A.B.; GILLETE, P.N.; KAPPAS, A.  
(1969) Am. J. Obstet. Gynec. 105, 843.
- 232.- SPELLACY, W.N.; GOETZ, F.C.; GREENBERG, B.Z.;  
Amer. J. Obst. Gyn. 90, 753.
- 233.- SPOTTO, P. (1962). Att. Soc. It. Ost. Gin, 49, 279.
- 234.- STEINBERG, D.; HUTTUNEN, J.K. (1972) En "Advances in  
cyclic Nucleotide Research" (Greengard, P. y Robinson  
A. eds.). 1, p. 47-62. Raven Press. New York.
- 235.- STOFFEL, W.; ACH, K.L.; (1964). Hoope-Seyler's Z.  
Physiol. Chem. 337, 123.

- 236.- STUDNITZ, W. von.; (1955) Scand. J.Clin. Lab.Invest.  
7, 329.
- 237.- SUNDLER, R.; AKESON, B.; NILSSON, A.; (1974).  
Biochim. Biophys. Acta 337, 248.
- 238.- SUTHERLAND, E.; BUTCHER, R. (1965). Rec.Prog.Horm.  
Res. 21, 623.
- 239.- SZABO, A.J.; GRIMALDO, R.D. (1970). Adv.Metab.  
Disord 4, 185.
- 240.- SWEENEY, M.J.; ASHMORE, J.; (1965) J. Metab.Clin.  
Exptl. 14, 516.
- 241.- TAYLOR, C.B.; BAILEY, E.; BARTLEY, W. (1967).  
Biochem. J. 105, 717.
- 242.- TURTLE, J.R.; KIPNIS, D.M. (1967) Biochem. Biophys.  
Acta 144, 583.
- 243.- TURTLE, J.R. (1972). En "Human reproductive physiolo-  
gy", (Blackwell, Oxford)
- 244.- UCHIDA, K.; NOMURA, Y.; KADOWAKI, M.; TAKEUCHI, N.;  
(1976) Endocrinol.Japan 23, 97
- 245.- VAGELOS, P.R. (1964) Ann. Rev.Biochem. 33, 139
- 246.- VAGELOS, P.R.; MAJERUS, P.W.; ALBERTS, A.W.; LARRA-  
BEE, A.R.; AILHAUD, G.P. (1966) Fed.Proc.25, 1485
- 247.- VAGELOS, P.R. (1971) En "Current Topics in cellu-  
lar Regulation". p. 116 Academic Press. London and  
New York.

- 248.- VAN TOL, A.; HULSMANN, W.; (1969). Biochim. Biophys. Acta 189, 342.
- 249.- VAUGHAN, M.; STEINBERG, D. (1963). J.Lipid. Res. 4 193.
- 250.- VILLE, C.A.; HAGERMAN, D.D.; HOLMBERG, N.; (1958) Pediatrics. 22, 953.
- 251.- VILLE, C.A.; LORING, J.M. (1961). Biochem. J. 81, 488
- 252.- VOLPE, J.J.; KISHIMOTO, Y.; (1972). J. Neurochem. 19, 737.
- 253.- VOLPE, J.J.; VAGELOS, P.R. (1973). Annual Rev.Biochem. 42, 21.
- 254.- WAKIL, S.J. (1961). J.Lipid Res. 2,1
- 255.- WAKIL, S.J.(1963). Proc.Int.Congr.Biochem. 5th. 1961, p. 3.
- 256.- WAKIL, S.J. ; PUGH, E.L.; SAUER, F.; (1964). Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 52, 106.
- 257.- WARTH, M.R.; ARKY, R.A.; KNOPP, R.H. (1973). J. Clin. Endocr. Metab. 41 , 649
- 258.- WATSON, J.A.; J.M. LOWENSTEIN.(1970) J. Biol.Chem. 245, 5993.
- 259.- WELT, L.D.; STETTEN, D.; INGLE, D.J.; MORLEY, E.H. (1952) J. Biol.Chem. 197, 57
- 260.- WEST, C.E.; PASSEY, R.F. (1967) Biochem. J. 102, 58

- 261.- WIDDOWSON, E.M. (1950). Nature (London) 166, 626.
- 262.- WILLES, R.F.; BODA, J.M.; MANNZ, J.G. (1969).  
Endocrinology 34, 520.
- 263.- WILLIAMS, P.F.; BAUTOVICH, G.J.; TURTLE, J.R. (1972).  
Proc. Aust. Soc.Med.Res. 3, 66.
- 264.- WILLIAMS, P.F.; SIMONS, J.A.; TURTLE, J.R. (1976).  
Hormone Res. 7, 83.
- 265.- WILLIAMSON, J.R.; GARCIA, A.; RENOLD, A.E.; CAHILL,  
G.F.; (1966). Diabetes 15, 183.
- 266.- WILLIAMSON, D.H.; HEMS, R.; (1970) En "Essays in  
Cell Metabolism". p. 257.
- 267.- WILLIAMSON, D.H. (1973). En Methods of Enz.Analysis"  
p. 257.
- 268.- WINAND, J.; FURNELLE, J.; CHRISTOPHE, J. (1968).  
Biochem.Biophys.Acta 152, 280.
- 269.- WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E.; (1967).  
Arch.Biochem.Biophys. 122, 362.
- 270.- WING, R.; ROBINSON, D. (1968). Biochem. J. 109, 841.
- 271.- YUNGAS, R.; SCHWARTZ, J.; (1970). En "Adipose tissue"  
p. 37, Ed. Jeanrenand-Hepp. London.
- 272.- ZUSPAN, F.P.; and GOODRICH S. ; (1968) Amer. J.  
Obstet. Gynec. 100, 7.